

**BILDUNG VON AMYLOID DURCH LIMITIERTE
PROTEOLYSE IN VITRO
ANTIGENE , STRUKTURELLE UND
MORPHOLOGISCHE BEFUNDE AN EINEM
KAPPA - I - BENCE - JONES - PROTEIN
EINES PATIENTEN MIT
A - KAPPA - I - AMYLOIDOSE**

ROLAND HUSS

Disbui. München
1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Immunologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Gert Riethmüller

B I L D U N G V O N A M Y L O I D D U R C H

L I M I T I E R T E P R O T E O L Y S E

I N V I T R O

ANTIGENE, STRUKTURELLE UND MORPHOLOGISCHE BEFUNDE

AN EINEM KAPPA-I-BENCE-JONES-PROTEIN

EINES PATIENTEN MIT A-KAPPA-I-AMYLOIDOSE

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Roland Huß

aus Memmingen

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. R.P. Linke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. med. W. Permanetter

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 1988

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	4
I EINLEITUNG	6
II FALLBESCHREIBUNG	14
III MATERIAL UND METHODEN	18
1 Chemikalien und Geräte	18
2 Immunchemische Methoden	18
2.1 Herstellung von Antiseren	18
2.2 Immundiffusion	19
2.3 Immunelektrophorese	20
3 Proteinchemische Methoden	21
3.1 Proteinfällung	21
3.2 Agarosegelelektrophorese	21
3.3 Charge-Shift-Elektrophorese	22
3.4 Zonenelektrophorese	23
3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	24
3.6 Gelchromatographie	25
4 Nachweis von Amyloid	26
5 Elektronenmikroskopische Darstellung	27
6 Photographie und Dokumentation	28

IV	RESULTATE	29
1	Isolierung des BJP MEV	29
1.1	Gewinnung des BJP MEV aus dem Urin	29
1.2	Nachweis des BJP MEV	29
1.3	Präperative Auftrennung der Urinproteine	31
2	Identifizierung des BJP MEV	33
3	Limitierte Proteolyse von Bence-Jones-Proteinen .	34
3.1	Verdauung von Bence-Jones-Proteinen unter verschiedenen Bedingungen	34
3.2	Auswahl eines Bence-Jones-Proteins	40
3.3	Optimale Verdauung von BJP MEV	43
3.4	Herstellung einer großen Menge von BJP MEV- Fragment mit Amyloidkonformation	45
4	Auftrennung der BJP MEV-Fragmente	46
5	Charakterisierung der amyloidbildenden Fibrillen	49
5.1	Antiseren gegen den variablen und den konstanten Teil des BJP MEV	49
5.2	Nachweis der antigenen Spezifität	51
5.3	Größenbestimmung des amyloidogenen Fragments	55
5.4	Aminosäuresequenz von BJP MEV und Amyloid MEV ...	56
5.5	N-terminale Aminosäuresequenz des In- vitro-Amyloids MEV	57
6	Bestimmung der Hydrophobizität des BJP MEV und seines Fragments	59
7	Elektronenoptische Morphologie	66
V	DISKUSSION	71
VI	LITERATURVERZEICHNIS	79

ZUSAMMENFASSUNG

Amyloidfibrillen können in vitro von bestimmten Bence-Jones-Proteinen durch limitierte Proteolyse erzeugt werden. Jedoch handelte es sich bisher immer um Bence-Jones-Proteine von Patienten ohne Amyloidose. Daher erhebt sich die Frage, inwieweit diese Experimente der Amyloidogenese in vivo entsprechen.

Dieser Arbeit liegt der Gedanke zugrunde, Amyloidfibrillen in vitro zu erzeugen, die von Bence-Jones-Proteinen von Patienten mit Amyloidose stammen, um dadurch dem In-vivo-Geschehen möglichst nahe zu kommen. Um das zu erreichen, wurden durch Manipulation der limitierten Proteolyse Bedingungen gesucht, unter welchen sich Amyloidfibrillen bilden.

Zunächst wurden mehrere Bence-Jones-Proteine unter Variation der maßgeblichen Parameter (Enzymkonzentration, Proteinkonzentration, pH, Zeit, Temperatur) verdaut und die resultierenden Fragmente auf ihre Fähigkeit untersucht, Amyloidfibrillen zu bilden. So wurden geeignete Rahmenbedingungen gefunden, unter denen Amyloid in vitro erzeugt werden kann.

Eines der Bence-Jones-Proteine, das BJP MEV, eignete sich aus mehreren Gründen besonders gut und wurde daher näher untersucht. Das BJP MEV stammt von einer Patientin mit IgG- κ -I-Plasmozytom und κ -I-Bence-Jones-Proteinurie und Amyloidose.

Dieses In-vitro-Amyloid wurde daraufhin weiter nach Antigenität, Größe und Hydrophobizität im Vergleich zum BJP MEV charakterisiert. Außerdem wurde das Präzipitat elektronenoptisch untersucht.

Dabei zeigte die antigene Charakterisierung, daß Antiseren gegen den konstanten Teil der α -Leichtkette nicht präzipitieren, dagegen Antiseren gegen den variablen Teil des BJP MEV ein Präzipitat ergeben, d. h. das In-vitro-Amyloid trägt antigene Strukturen des variablen Teils des BJP MEV.

Die Größenbestimmung durch Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ergab, daß das vorherrschende Fragment etwa die Größe der halben Leichtkette besitzt, das Molekulargewicht also um 11 000 d liegt. Eine andere Methode, die Gelfiltration, kam zum gleichen Ergebnis.

Die Hydrophobizität des BJP MEV und des amyloidogenen Fragments wurde mit Hilfe der Charge-Shift-Elektrophorese verglichen. Dabei zeigte sich eine Zunahme der Hydrophobizität des amyloidbildenden Spaltprodukts gegenüber dem ganzen BJP MEV.

Die elektronenoptische Morphologie der Fibrillen zeigte eine für Amyloidfibrillen typische Struktur. Die Fibrillen sind in Bündeln angeordnet, die ein apositionelles "Wachstum" der Fibrillen nahelegen.

Diese Resultate zeigen, daß es gelingt, Bence-Jones-Proteine auch bei Patienten mit Amyloidose so zu verdauen, daß ein In-vitro-Amyloid entsteht, das die gleichen Eigenschaften besitzt, wie die in vivo generierten Fibrillen bezüglich Antigenität, Größe und elektronenoptischem Aussehen. Die Zunahme der Hydrophobizität des amyloidogenen Fragments im Vergleich zum intakten BJP MEV ist wahrscheinlich der entscheidende Faktor für die Amyloidentstehung. Dieser Befund könnte auch für die Bildung anderer Amyloidfibrillenproteine von grundlegender Bedeutung sein.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

(alphabetisch geordnet)

A	in vivo entstandenes Amyloid des jeweiligen amyloido- genen Proteins
"A"	in vitro erzeugtes Amyloid
AA	Amyloid-A-Protein
AE _t	lokales Amyloid beim medullären Schilddrüsenkarzinoms
AF _p	Amyloid bei der portugiesischen familiären Amyloidpo- lyneuropathie
A κ	AL vom Kappa-Isotyp
A λ	AL vom Lambda-Isotyp
AL	Amyloid vom Immunglobulin-Leichtketten-Typ
ASb	Amyloid bei der senilen und präsenilen Gehirnamyloidose
ASC ₁	Amyloid bei der senilen kardiovaskulären Amyloidose
BJP	Bence-Jones-Protein(e)
C	Konstanter Teil der Immunglobulinleichtkette
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Dalton
DOC	Natriumdeoxycholat
E	Extinktion
IgG	Immunglobulin G
L	Leichte Kette des Immunglobulins
M	molar
MEV	Abkürzung eines Patientennamens, wie auch ACK, CLE, GIN, GRI, HAN, HEN, KAE, KOC, MIT, MUE, NYM, REI, ULI, ZIM
NHS	Normales menschliches Serum

PBS	Natriumphosphat-gepufferte 0,9 % Natriumchloridlösung
SAA	Serum Amyloid-A-Protein
SAAL	Niedermolekulare Komponente von SAA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTR	Transthyretin (Präalbumin)
V	Variabler Teil der Immunglobulinleichtkette



I EINLEITUNG

Amyloidose bezeichnet eine heterogene Krankheitsgruppe, die durch Ablagerungen der pathogenen Eiweißsubstanz Amyloid im Organismus gekennzeichnet ist. Man spricht bei generalisiertem Befall von Amyloidose, bei überwiegend lokalisiertem Befall von Amyloidablagerungen (Linke, 1982).

Der Begriff "Amyloid" bedeutet "stärkeähnlich". Er wurde von Virchow 1854 eingeführt, der ein stärkeähnliches Verhalten bei Anfärbung mit Lugolscher Lösung fand. 1859 wurde jedoch durch Friedreich und Kekulé die Eiweißnatur chemisch nachgewiesen. Es folgte die Aufdeckung der Fibrillennatur (Cohen und Calkins, 1964) und der β -Faltblattstruktur (Ein und Glenner, 1968). Durch Pras et al. (1968) gelang schließlich die Isolierung der Amyloidfibrillen, was der chemischen Charakterisierung den Weg bereitete. Die Entdeckung verschiedener Amyloidfibrillenproteine, wie Immunglobulinfragmente (Glenner et al., 1972; Husby et al., 1981; Kimura et al., 1972; Skinner et al., 1974; Terry et al., 1973) und Amyloid-A-Protein (Benditt und Eriksen, 1971; Levin et al., 1972), sowie die Bildung von Amyloid aus Bence-Jones-Proteinen (Glenner et al., 1971; Linke et al., 1973), Insulin und Glucagon (Glenner et al., 1974; Linke et al., 1976) machte die chemische Heterogenität deutlich.

Heute versteht man unter Amyloid unterschiedliche Proteine, die nach Glenner und Mitarbeitern, 1974, durch folgende drei Kriterien definiert sind:

1. Bindung von Kongorot und grüne Doppelbrechung im polarisierten Licht.
2. Fibrillennatur: Im Elektronenmikroskop stellen sich Amyloidfibrillen als ca. 10 nm dicke, unverzweigte, oft in Bündeln vorkommende Strukturen von unbestimmter Länge dar.
3. β -Faltblattstruktur: Alle bisher untersuchten natürlichen Amyloide wiesen mit Hilfe röntgenkristallographischer und infrarotspektroskopischer Untersuchungen eine antiparallele β -Faltblattstruktur auf.

Die chemische Heterogenität der Amyloidkrankheiten ermöglicht eine Klassifizierung. Dadurch wurden die früher üblichen morphologischen Unterscheidungen in typisch und atypisch (Lubarsch, 1929), primär und sekundär, periretikulär und perikollagen (Missmahl und Hartwig, 1953), subendothelial und adventitial (Cohen, 1967), Typ I und Typ II (Isobe und Osserman, 1974) weitgehend abgelöst (Linke, 1987). Da bei bestimmten Amyloidkrankheiten die Pathogenese noch nicht aufgeklärt ist, ist mit der Entdeckung weiterer Amyloidklassen zu rechnen.

Nach der Chemie der Amyloidfibrillenproteine ergibt sich derzeit folgende Klassifizierung (Glenner et al., 1976; Glenner, 1980).

Eine erste Gruppe, Typ AL ($A\lambda$ oder $A\lambda$) umfaßt eine Reihe von unterschiedlichen Erkrankungen, die durch das Auftreten von monoklonalen Plasmazellproliferationen gekennzeichnet sind. Diese bilden monoklonale leichte Immunglobulinketten (L), entweder vom λ - oder vom κ -Typ (Glenner et al., 1971). Es handelt sich um Erkrankungen wie Multiples Myelom, Bence-Jones-Plasmozytom, B-Zell Tumore, Morbus Waldenström, Schwere-Ketten-Krankheit und andere. Eine weitere Variante der Plasmazelldyskrasie, die manchmal mit einer Bence-Jones-Proteinurie ohne weitere Symptome eines malignen Plasmozytoms einhergeht, wird als idiopathische Amyloidose des AL-Typs bezeichnet (Isobe und Osserman, 1984; Osserman et al., 1964).

Eine zweite große Gruppe, die aber mehr Homogenität aufweist, tritt bei chronisch-entzündlichen oder mit rekurrerendem Fieber einhergehenden Erkrankungen, wie Tuberkulose, Osteomyelitis, Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis (Benditt und Eriksen, 1971; Sletten und Husby, 1974; Husby 1980), Muckle Wells-Syndrom (Linke et al., 1983) u. a. auf. Hier werden die Amyloidfibrillen durch das Amyloid-A-Protein (AA) gebildet (Benditt und Eriksen, 1971), das ein Fragment des Serumamyloid-A-Proteins (SAA), ein α_1 -Globulin mit Akutphasencharakter (Linke et al., 1975; Rosenthal und Franklin, 1975), ist. Wenn keine Grunderkrankung erkennbar ist, spricht man auch hier von einer idiopathischen AA-Form.

Schließlich sind hereditäre Formen der Amyloidose bekannt, so die portugiesische familiäre Amyloidpolyneuropathie, die man

mit AF_p abkürzt (Benditt et al., 1980; Costa et al., 1978). Dabei ist das fibrillenbildende Vorläuferprotein eine bestimmte Präalbumin-Variante mit einem Aminosäureaustausch in Position 30 (Val $\rightarrow$ Met) (Tawara et al., 1983). Präalbumin wird auch als Transthyretin (TTR) bezeichnet. Weiterhin findet man beim medullären Schilddrüsenkarzinom lokales Amyloid, Typ AE_t . Das Ausgangsprodukt ist hier ein Kalzitoninghomolog (Sletten et al., 1976). Auch β_2 -Mikroglobulin wurde als amyloidogen erkannt (Gejyo et al., 1985). Weitere Polypeptidhormone wie Insulin, Glucagon und Parathormon sind in vitro zur Amyloidbildung befähigt (Glenner et al., 1974; Linke et al., 1976; Kedar et al., 1976).

Völlig verschieden von den anderen Formen ist das Gehirnamyloid bei der Alzheimerschen Krankheit und der kongophilen Angiopathie (Glenner, 1983; Glenner und Wong, 1984). Man spricht hier vom ASB-Typ. Eine im Senium vorkommende, vor allem das kardiovaskuläre System befallende Amyloidose, wird ASc_1 -Amyloidose genannt. Hier handelt es sich um Präalbuminablagerungen (Sletten et al., 1980). Im Gegensatz dazu liegt bei der hereditären Apoplexie in Island eine Form der Amyloidose vor, bei der das Vorläuferprotein chemisch eng mit dem γ -Trace-Protein, das vom Cystatin C abstammt, verwandt ist (Cohen et al., 1983).

Die Amyloidosen vom AL-Typ repräsentieren die größte und auch maligneste Amyloidform. Sie besitzen daher auch große klinische Bedeutung. Da hier bisher keine befriedigende Therapie bekannt ist (Kyle et al., 1985; Fielder und Durie, 1986), wäre eine

bessere Einsicht in den Mechanismus ihrer Entstehung notwendig.

Das große Spektrum leichtketteninduzierter klinischer Syndrome mit unterschiedlichem Verteilungsmuster der Amyloidablagerungen wird durch folgende Beispiele belegt (Glenner und Page, 1976):

Generalisierte Amyloidose mit Befall von Milz, Leber, Niere und anderen Organen; überwiegend lokalisierte Amyloidablagerungen, bei denen nur einzelne Organe befallen sind, z. B. Leber- aber keine Nierenbeteiligung; Hautamyloidose ohne Befall innerer Organe; selektiver Befall der retroperitonealen Lymphknoten; nur tracheobronchiale oder urogenitale Ablagerungen. Weiterhin können ein Karpaltunnelsyndrom oder eine Neuropathie Symptome von Amyloidablagerungen darstellen. Selten findet sich ein solitärer Rundschatten in der Lunge oder im Knochen, der als Amyloidom bezeichnet wird.

Auch die Chemie der den Amyloidfibrillen zugrundeliegenden Leichtketten ist nicht einheitlich. So kennt man verschiedene Isotypen, α oder λ , die sich wiederum in Subgruppen unterteilen lassen, z. B. λ I, λ II / IV, die unterschiedliche Prävalenz zur Amyloidbildung aufweisen. Es werden häufiger Amyloidosen vom λ -Typ als vom α -Typ gefunden (Glenner und Page, 1976). Das Auftreten der Leichtkette vom Subtyp λ VI geht meistens mit einer Amyloidose einher (Glenner, 1980; Husby und Sletten, 1980; Sletten et al., 1981; Solomon et al., 1982; Natvig et al., 1981).

Die Leichtkettenfragmente aus Amyloidablagerungen variieren von 5 000 bis 23 000 Dalton, wobei die meisten um 10 000 bis 12 000 Dalton liegen. Häufig werden mehrere unterschiedlich große Spaltprodukte der leichten Kette in einem Patienten gefunden.

Die Entstehung der Spaltprodukte aus den zugrundeliegenden Immunglobulinen geschieht durch limitierte Proteolyse. Wie aber diese In-vivo-Proteolyse vor sich geht, liegt noch weitgehend im Dunkeln. Bei der Spaltung dürften bestimmte proteolytische Enzyme die entscheidende Rolle spielen, die entweder zu aktiv oder zu wenig aktiv sind. Dies kann man aus der Chemie der Amyloide schließen. Art und Umfang der Spaltmöglichkeiten in vivo sind unbekannt.

Wie man in vitro die Amyloidogenese durch limitierte Proteolyse imitieren kann, ist bereits berichtet worden:

So wurden λ - und κ -Bence-Jones-Proteine mit Pepsin gespalten, wobei sich bei einem Teil Präzipitate bildeten, die sich sowohl Kongorot anfärben ließen, als auch grüne Doppelbrechung zeigten. Auch elektronenoptische und röntgenkristallographische Methoden erlaubten keine Unterscheidung des in vitro erzeugten vom nativen Amyloid (Glenner et al., 1974; Linke et al., 1973).

Limitierte Proteolysen mit Trypsin, Pepsin und Urin (mit nicht näher charakterisierter proteolytischer Aktivität) von einer großen Zahl von λ -Bence-Jones-Proteinen erbrachten wei-

tere In-vitro-Amyloide, die ebenfalls die Kriterien des Amyloids erfüllten (Glenner et al., 1971; Linke et al., 1973; Linke, 1978). Dabei gehörten die meisten Bence-Jones-Proteine, aus denen Amyloidfibrillen generiert werden konnten, der V λ I-Subgruppe an. Auch konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit, Amyloidfibrillen zu bilden, unabhängig vom konstanten Teil (Oz-Marker) ist (Linke et al., 1973).

Bei der Verdauung von Bence-Jones-Proteinen mittels lysosomaler Nierenextrakten wurden Präzipitate gewonnen, die sich mit Kongorot anfärben ließen und grüne Doppelbrechung zeigten (Epstein et al., 1974). Auch elektronenmikroskopisch und infrarotspektrometrisch wiesen diese Präzipitate keinen Unterschied zu den natürlich vorkommenden Amyloiden auf (antiparallele β -Konformation). Folgende Besonderheiten des bisher eingesetzten In-vitro-Modells der limitierten Proteolyse zeigen jedoch, daß dieses Modell dem In-vivo-Geschehen nicht ganz entspricht:

1. Nur Bence-Jones-Proteine von Patienten ohne Amyloidose konnten bisher in vitro zu Amyloidfibrillen transformiert werden.
2. Die Isotypenprävalenz der Amyloidfibrillen in vitro mit Bevorzugung von V λ I unterscheidet sich von denen in vivo. Bei letzteren dominiert λ I, λ II/IV und λ VI.
3. Schließlich fehlt den In-vitro-Amyloidfibrillen das N-terminale Peptid, das bei den In-vivo-Fibrillen (bis auf wenige Ausnahmen) vorhanden ist.

V DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, daß es gelingt, ein Bence-Jones-Protein von einem Patienten mit Amyloidose durch eine limitierte Proteolyse so zu verdauen, daß auch in vitro Amyloid entsteht.

Dies gelang durch Anpassung der Versuchsbedingungen für die limitierten Proteolysen speziell an ein bestimmtes Bence-Jones-Protein. Dadurch wurde dem individuellen Charakter des Bence-Jones-Proteins Rechnung getragen, in der Hoffnung, damit auch der Wirklichkeit des Krankheitsgeschehens näher zu kommen.

Die bisher unternommenen Versuche, bei denen Bence-Jones-Proteine einer limitierten Proteolyse unterzogen wurden, lagen dem In-vivo-Geschehen ferner, da zum Teil unphysiologische Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel Verdauung durch Pepsin bei pH 3,5 (Glenner et al., 1971; Linke et al., 1973), zugrunde gelegt wurden, um ein Präzipitat mit Amyloidcharakter zu generieren.

Hier wurden möglichst physiologische Parameter (Temperatur 37° C, pH 7,4) an einer Serie von Bence-Jones-Proteinen eingesetzt.

Aus 11 Bence-Jones-Proteinen, die der optimierten limitierten Proteolyse aus den Vorversuchen unterzogen worden waren, wurde BJP MEV ausgewählt. Die Wahl fiel auf BJP MEV, da dieses unter

den genannten Versuchsbedingungen die größte Menge an Präzipitat bildete. Dieses Präzipitat ließ sich mit Kongorot anfärben und zeigte die typische grüne Doppelbrechung. Schließlich wurde BJP MEV auch aus dem Grunde für weitere Studien ausgewählt, da von diesem Protein das natürlich vorkommende Amyloid vollständig sequenziert worden ist (Eulitz und Linke, 1982).

Von den 11 untersuchten Bence-Jones-Proteinen (6 μ - und 5 λ -BJP) bildete sich bei 7 ein Präzipitat (4 μ - und 3 λ -BJP). Davon waren 3 mit Kongorot anfärbbar und zeigten grüne Doppelbrechung.

Die Präzipitate der anderen 4 Bence-Jones-Proteine banden weder Kongorot noch zeigten sie grüne Doppelbrechung. Möglicherweise handelte es sich in diesen Fällen um Leichtkettenaggregate, die bei dem Verdauungsprozeß aus den zugrunde liegenden Bence-Jones-Proteinen entstanden sind. In Übereinstimmung damit wird von Leichtkettenaggregaten ohne Amyloidnatur nach In-vitro-Verdauung berichtet, sowie von in vivo beobachteten Leichtkettenablagerungen (Linke et al., 1973; Randall et al., 1976; Glenner, 1980; Linke, 1985).

In zwei kürzlich veröffentlichten Fällen liegen sogar beide Erkrankungen, d. h. Amyloidose und Leichtkettenablagerungen beim selben Patienten vor (Hofman-Guillaine et al., 1985; Scherwitz et al., 1985).

Es konnten auch Präzipitate gefunden werden, die sich mit Kongorot anfärben ließen, aber keine grüne Doppelbrechung aufwiesen (Linke et al., 1973). In der vorliegenden Untersuchung konnte diese Konstellation jedoch nicht beobachtet werden.

Die Klinik zeigte bei der ersten Einweisung multiple ossäre Destruktionen der Wirbelsäule, anfangs eine Erniedrigung des 12. Brustwirbelkörpers, dann fortschreitend bis zum Tode innerhalb von sechs Jahren eine Höhenminderung von 6 cm.

Unter einer Endoxan-Monotherapie, die im Anschluß an den ersten Krankenhausaufenthalt durchgeführt wurde, blieb die Körperbeweglichkeit erhalten und es bestand auch ein relatives Wohlbefinden bis etwa ein halbes Jahr vor dem Exitus. Im weiteren Verlauf wurde das klinische Bild zunehmend durch die fortschreitende Kardiomegalie und Kachexie bestimmt.

Eine im letzten Lebensjahr erfolgte Rektumbiopsie erbrachte die Diagnose einer Amyloidose; durch histologische Untersuchung von schmierigen amyloidhaltigen Belägen der makroglossär veränderten Zunge (EBbeschwerden!) wurde diese Diagnose bestätigt (Abb. 1).

Daneben bestanden periorale und perianale papilläre Hautveränderungen, teigige Bauchdecken und starke Auftreibungen an beiden Handwurzeln.

Als Diagnose ergab sich ein IgG₁- κ -I-Plasmozytom mit κ -I-Bence-Jones-Proteinurie mit generalisierter perikollagener (sekundärer) Amyloidose (Abb. 2). Der Isotyp des Myelomproteins wurde mit IgG-isotypspezifischer Antiseren in der Immundiffusion bestimmt und die Subgruppe des BJP MEV mittels Aminosäuresequenzanalyse (Eulitz und Linke, 1982).

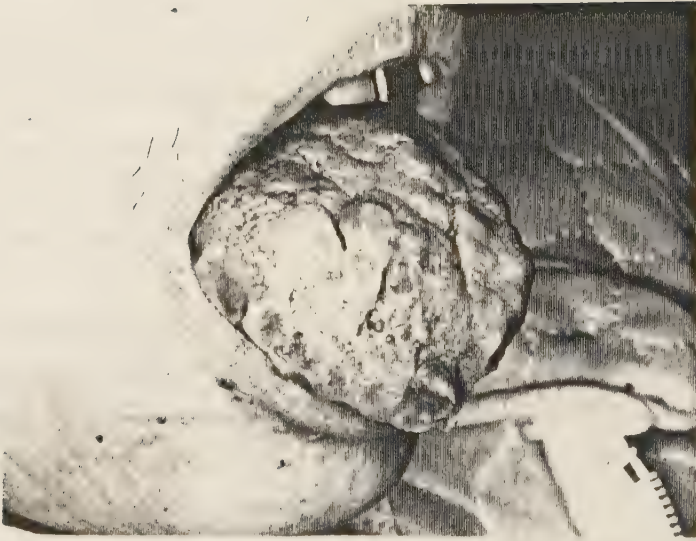


Abb. 1

Abb. 1:

An der herausgestreckten, stark vergrößerten Zunge sieht man deutlich die Desquamation von Gewebe, das sich histologisch als massiv mit Amyloid infiltriert erwies.

Abb. 2 A und B (siehe nächste Seite):

Nachweis von Amyloid am Jejunum der Patientin MEV.

2 A: Anfärbung von Amyloidablagerungen in Gefäßwänden mit Kongorot (Pfeile)

2 B: Grüne Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop der mit Kongorot angefärbten Strukturen

Paraffinschnitt, Abbildungsmaßstab 189 : 1 (Faktoren: Okular 8x, Objektiv 6,3x, Kamerafaktor nach Angaben von Leitz 1,25x, Bildvergrößerung vom Diapositiv 3x).

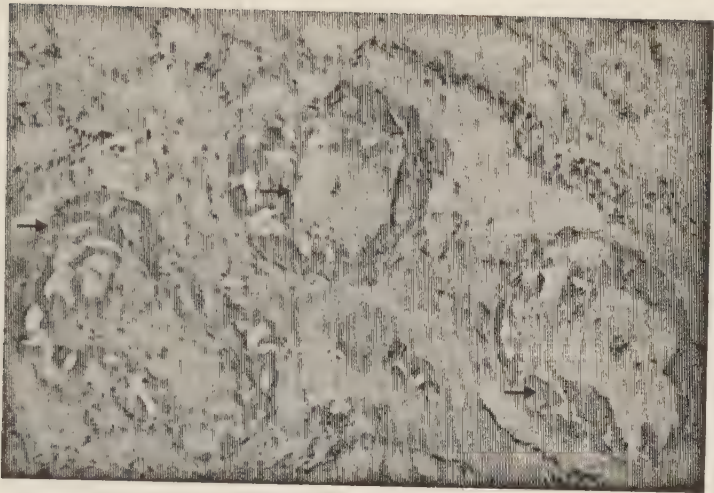


Abb. 2 A

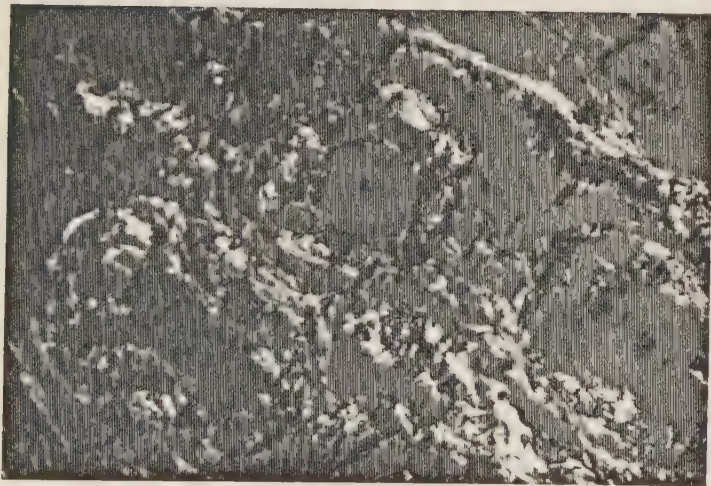


Abb. 2 B

III MATERIAL UND METHODEN

1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht anders angegeben, von Fa. Merck, Darmstadt.

Die benutzten Geräte werden bei ihrer Nennung spezifiziert.

2 Immunchemische Methoden

2.1 Herstellung von Antiseren

Zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen wurde 1 mg gereinigtes Bence-Jones-Protein in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgelöst und mit 1 ml komplettem Freund'schen Adjuvant (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA) emulgiert.

Diese Protein-Puffer-Öl-Emulsion wurde einem ausgewachsenen Kaninchen subkutan an mehreren Stellen injiziert. Die Immunisierungen wurden in vierwöchigen Abständen wiederholt. Blutabnahmen erfolgten aus einer Ohrarterie (maximal 50 ml) etwa 10 Tage nach den Boosterimpfungen. Das durch Zentrifugieren gewonnene Serum wurde bei -20°C eingefroren und gelagert.

Die Herstellung der anderen verwendeten Antiseren erfolgte auf die gleiche Weise. Zur Herstellung eines Antiserums, das gegen die V-Region eines Bence-Jones-Proteins gerichtet ist, wurde das Rohantiserum mit einem Bence-Jones-Protein der gleichen Subklasse für eine Stunde bei Raumtemperatur (1 mg/ml Serum) inkubiert und absorbiert (siehe auch IV.5.1).

2.2 Immundiffusion

Mit Hilfe der Immundiffusion (Ouchterlony, 1958; Ouchterlony et al., 1978) wurde die Reinheit von Antigenen und die Aktivität von Antikörpern bestimmt. Dazu wurde 1,5 % Agarose (Seakem, Marine Colloids, Rockland, USA) in 0,025 M Barbitalspuffer pH 8,6 suspendiert, mit 0,02 % NaN_3 versetzt und unter Rühren zum Kochen gebracht. Mit einer erwärmten Glaspipette wurde jeweils 5 ml dieser Lösung in eine waagrecht gelagerte Plastikpetrischale ($\varnothing$ 5 cm; Greiner, Nürtingen) aufgetragen (Schichtdicke 2 - 3 mm). Nach dem Abkühlen wurde ein Deckel aufgesetzt und die Schalen in einer feuchten Kammer bei 4° C aufbewahrt. Die Auftragslöcher wurden mittels einer Schablone ausgestanzt. Anschließend wurden die Löcher mit Antigenen bzw. Antikörpern gefüllt.

Um eine optimale Präzipitation zu erzielen, wurden folgende Variationen benutzt: verschiedene Abstände und Durchmesser der Löcher, verschiedene Verdünnungskombinationen, ein- oder mehrmaliges Füllen der Löcher unter Wahrung der Diffusionskontinuität, sowie Inkubation der Schalen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 24 Stunden oder bei 4° C für 48 Stunden. Anschließend wurden die Präzipitationslinien abgelesen und dokumentiert.

2.3 Immunelektrophorese

1,5 % Agarose-Suspension in 0,025 M Barbitalpuffer, pH 8,6, unter Zusatz von 0,02 % NaN_3 wurde erhitzt. 20 ml dieser Lösung wurde mit einer erwärmten Glaspipette vorsichtig auf die hydrophile Seite eines waagrecht liegenden Gel-Bondfilm, 9 x 12 cm (Mast Diagnostica, Hamburg), aufpipettiert. Nach dem Abkühlen wurde die beschichtete Folie bei 4° C in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Vor der Durchführung der Elektrophorese wurden die Löcher für die Proben und die Rillen für die Antisera mit Hilfe einer Schablone ausgestanzt. Die Proben ($50\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$) wurden in Barbitalpuffer gelöst und mit Bromphenolblau als Laufmarker angefärbt und aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur in einem LKB Multiphor (LKB Instruments, Gräfelfing) bei einer Stromstärke von 30 bis 50 mA in 0,025 M Barbitalpuffer, pH 8,6, durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese schwankte zwischen 1 und 2 Stunden. Sie wurde beendet, wenn das Bromphenolblau die Strecke zwischen Auftragsloch und Trogende zurückgelegt hatte. Die Rillen wurden mit dem entsprechenden Antiserum gefüllt und nach 1 bis 2 Tagen bei 4° C im Dunkelfeld betrachtet und dokumentiert.

3 Proteinchemische Methoden

3.1 Proteinfällung

Gekühlt gesammelter Urin wurde bei 80 % gesättigtem Ammoniumsulfat (561 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l Urin) über Nacht bei 4° C präzipitiert. Das Prinzip dieser Proteinfällung besteht darin, daß durch Wasserentzug die Proteine an Löslichkeit verlieren. Das entstandene Präzipitat wurde zweimal in 80 % gesättigtem Ammoniumsulfat gewaschen und danach jedesmal abzentrifugiert. Das letzte Sediment wurde in wenig PBS suspendiert und gegen H_2O dialysiert und lyophilisiert.

3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Herstellung der Agaroseplatten erfolgte in der bei der Immunelektrophorese angegebenen Weise, jedoch wurden hier mittels eines aufgesetzten Kammes 1 cm breite Auftragsrinnen für die Proben beim Gießen der Platten ausgespart. Die Proben (20 mg/20 μl) wurden mit Bromphenolblau als Laufmarker versetzt und in die Rinnen gefüllt.

Die Elektrophorese wurde bei 40 mA und 220 V für etwa 2 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Gele mit 0,5 % Amidoschwarz (Serva, Heidelberg) in 50 ml Äthanol/Eisessig (9 : 1; Volumen/Volumen) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und gefärbt und anschließend zweimal in 200 ml Äthanol/Eisessig (Verhältnis wie oben) entfärbt und auf Filterpapier getrocknet.

3.3 Charge-Shift-Elektrophorese

Zur Sichtbarmachung der Hydrophobizität des BJP MEV und seiner Fragmente wurde die Charge-Shift-Elektrophorese angewandt (Helenius und Simons, 1977).

Dabei handelt es sich im Prinzip um eine Agarosegelelektrophorese, die allerdings in verschiedenen Puffern durchgeführt wurde.

Die unterschiedlichen Puffersysteme waren:

1. 0,03 M Barbitalpuffer pH 8,6 und 5 g Triton X-100/l als neutrale Micellen,
2. 0,03 M Barbitalpuffer pH 8,6 und 5 g Triton X-100/l und 2,5 g DOC/l als negativ geladene Micellen,
3. 0,03 M Barbitalpuffer pH 8,6 und 5 g Triton X-100/l und 0,5 g CTAB/l (Serva, Heidelberg) als positiv geladene Micellen.

Die Lösungspuffer für die Proben enthielten jeweils die vierfache Konzentration an geladenen Detergenzien (DOC, CTAB).

Die Färbung und Fixierung der Gele erfolgte in Pikrinsäure (10/1)/Eisessig (5:1, Volumen/Volumen) für 15 Minuten. Entfärbt wurde mit 95 % Alkohol für 2 bis 3 Minuten. Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier getrocknet.

3.4 Zonenelektrophorese

Die aus dem Urin gewonnenen Proteine (siehe III.3.1) wurden mittels der Zonenelektrophorese entsprechend ihrer elektrischen Ladung in Pevicon (Pevicon C 870, Serva, Heidelberg), einem Copolymer aus Polyvinylchlorid und Polyvinylacetat, als inerter Träger, präperativ aufgetrennt.

Mit 0,1 N Barbitalpuffer, pH 8,6, äquilibriert und vermengt, wurde diese Masse in eine 48 x 18 x 1,5 cm große Wanne gegossen. Der überschüssige Puffer wurde durch Auflegen von Filterpapier entfernt und der Block bei 4° C gelagert.

In 12 cm Entfernung von der Kathodenseite wurde eine 0,5 cm breite und 14 cm lange Rinne für die Proteinlösung ausgehoben. 800 mg der durch die Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Urinproteine wurden in Barbitalpuffer gelöst und zur Laufkontrolle mit Bromphenolblau versetzt.

Diese Proteinlösung wurde in die Rinne gefüllt und im elektrischen Feld bei 200 Volt und 45 mA aufgetrennt. Nach 24 Stunden Laufzeit bei 4° C wurde der Pevicon-Block in 2 cm breite Fraktionen, senkrecht zur Laufrichtung, eingeteilt, jeweils mit 5 ml PBS eluiert und die Proteinkonzentration durch Absorptionsspektrometrie gemessen (bei 280 nm, wobei $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 12,0$ für monoklonale leichte Immunglobulinketten angenommen wurde, Metzger, 1965).

Um die das Bence-Jones-Protein enthaltende Fraktion zu ermitteln, wurde anschließend eine Immundiffusion durchgeführt.

3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Reinheit und die Größe des BJP MEV und dessen Spaltprodukte bestimmt.

Die Elektrophoresekammer entsprach üblichen vertikalen Plattenelektrophoresekammern und hatte die Größe 180 x 160 x 1,5 mm. In dieser Arbeit wurde das System nach Shapiro et al. (1967) benutzt.

Es wurde ein 5 % Polyacrylamidgel und ein Laufpuffer mit jeweils 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,1, mit 0,1 % SDS verwendet. Um die Bläschenbildung zu verhindern und um das Radikal O_2 als Polymerisationsinhibitor zu entfernen, wurde vor dem Start der Polymerisation durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat für 30 Minuten mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Polymerisationsdauer lag bei Raumtemperatur bei einer Stunde.

10 bis 50 μ g Protein wurden in 50 μ l Probenpuffer (1 % SDS und 1 % Mercaptoäthanol) bei 100° C denaturiert. Anschließend wurde jeweils 100 μ l dieser Probe in die Probentaschengefüllt und die Pufferreservoire mit dem Laufpuffer beschickt. Danach wurde die Elektrophorese mit 80 V bei etwa 35 mA gestartet. Nach dem Eindringen der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Die Elektrophoresedauer betrug etwa 4 Stunden.

Die Färbung und Fixierung der Gele erfolgte in 0,5 % Coomassie Blue R 250 (Serva, Heidelberg) in 45 % Äthanol und 10 % Äthanol und 7 % Eisessig bei gleichen Temperatur über mehrere Stunden. Anschließend wurden die Resultate dokumentiert.

Die annähernd lineare Korrelation zwischen Wanderungsstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine im Bereich von 10 000 bis 75 000 d konnte zur Größenbestimmung herangezogen werden (Weber und Osborn, 1969). Als Referenzproteine mit bekanntem Molekulargewicht wurden Rinderalbumin (66 000 d), Ovalbumin (44 000 d), Pepsin (35 000 d), BJP MEV (reduziert und alkyliert, 23 000 d), Cytochrom C (12 300 d), Insulin (5 600 d), Insulin-A-Kette (3 600 d) verwendet (alle Proteine von Sigma, Heidelberg; Ausnahme: BJP MEV).

3.6 Gelchromatographie

Die präperative Auftrennung der durch die limitierte Proteolyse gewonnenen Präzipitate erfolgte durch absteigende Gelchromatographie über Sepharose G-100 (Deutsche Pharmacia, Freiburg) in einer Glassäule mit der Größe 95 x 2,5 cm. Die Präzipitate wurden in 5 M Guanidin-HCl (in H₂O) gelöst (60 mg/3 ml) und bei Raumtemperatur im gleichen Lösungsmittel mit konstantem Druck von 20 cm H₂O (Mariottische Flasche) aufgetrennt. Das Elutionsprofil wurde bei 280 nm absorptionspektrometrisch gemessen und in Fraktionen bei einer Tropfenzahl von 120/Röhrchen gesammelt mittels eines Fraktionssammlers LKB Uvicord II Monitor (LKB Instruments, Gräfelfing). Anschließend wurden die Fraktionen entsprechend dem Elutionsprofil zusammengefaßt und in Dialyseschläuche (Visking Typ 27/32, Serva, Heidelberg) gefüllt. Diese Dia-

lyseschläuche wurden zuvor für 15 Minuten in Wasser gekocht, um die Porenweite (Ausschlußgrenze bei 10 000 d) zu verringern. Die Dialyseschläuche wurden bei 4° C gegen destilliertes Wasser, das täglich mehrmals gewechselt wurde, dialysiert. Bei einer Konduktivität unter 1 mosmol wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

Zur Kalibrierung der Sepharose G-100 Säule wurden Proteine mit bekannter Größe in einem nachfolgenden Lauf getrennt. Unter Verwendung des linearen Verhältnisses zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und dem Quotienten aus Elutions- und Ausschlußvolumen bzw. der Zahl des Röhrchens, in welchem der Hauptanteil des entsprechenden Proteins war, wurde das Molekulargewicht bestimmt. Die verwendeten Markerproteine waren Cytochrom C (12 300 d), Meerrettichperoxidase (40 000 d) und Rinderalbumin (66 000 d) (alle Serva, Heidelberg).

4 Nachweis von Amyloid

Der Nachweis von Amyloid erfolgte mittels der Kongorotfärbung nach Puchtler et al. (1962).

Folgende haltbare Stammlösungen wurden benötigt:

S₁ = 80 % Äthanol in gesättigter NaCl-Lösung

S₂ = 80 % Äthanol in gesättigter NaCl-Lösung und gesättigter Kongorotlösung.

Daraus wurden die nicht haltbaren Arbeitslösungen vor Gebrauch angesetzt:

$A_1 = 50 \text{ ml } S_1 + 0,5 \text{ ml einer } 1 \% \text{ NaOH-Lösung}$

$A_2 = 50 \text{ ml } S_2 + 0,5 \text{ ml einer } 1 \% \text{ NaOH-Lösung}$

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Der Objektträger mit der Probe wurde für 20 Minuten in Lösung A_1 gestellt, dann für die gleiche Zeit in Lösung A_2 , die unmittelbar vor Gebrauch gefiltert wurde. Die Differenzierung erfolgte für 30 Sekunden in 100 % Äthanol. Anschließend wurde über eine absteigende Alkoholreihe entwässert. Bei Gewebsschnitten wurde mit saurem Hämalaun (nach Meyers) gefärbt.

Am Ende wurde der Schnitt über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol übergeführt und in Canadabalsam eingebettet.

5 Elektronenmikroskopische Darstellung

Für elektronenoptische Untersuchungen wurden durch limitierte Proteolyse gewonnene Präzipitate in 2 % Phosphorwolframsäure, pH 5,0, suspensiert, auf Pioloform F beschichtete Kupfernetze 3.05, 150 mesh, Code Nr. 0025 (Polaron, Bio Rad, München) aufgebracht und überschüssige Flüssigkeit durch Filterpapier von der Seite her abgesaugt. Nach etwa 1 Stunde Trocknen bei Raumtemperatur wurden die beladenen Kupfernetze in einem Siemens Elmiskop I Elektronenmikroskop bei 80 kV betrachtet und photographiert.

6 Photographie und Dokumentation

Die Ergebnisse der Versuche wurden protokolliert, die Resultate der Elektrophoresen und Immundiffusionen zweifach unabhängig voneinander zeichnerisch festgehalten.

Photographien wurden mit einer Leitz-Kamera (Leitz, Wetzlar) auf einen XRS-100 Film (Agfa-Gaevert, Leverkusen) aufgenommen und auf Ilfordpapier (Ilford, Fribourg, Schweiz) vergrößert.

IV RESULTATE

1 Isolierung des BJP MEV

1.1 Gewinnung des BJP MEV aus dem Urin

Der gesammelte Urin der Patientin MEV wurde einer Proteinfällung mit Ammoniumsulfat unterzogen (siehe III.3.6).

Die so gewonnenen Proteine wurden folgendermaßen charakterisiert.

1.2 Nachweis des BJP MEV

Serum und Urinproteine der Patientin MEV wurden auf das Vorhandensein eines monoklonalen Immunglobulins und einer monoklonalen Leichtkette mit Hilfe von Antiseren gegen die α -, μ -, γ -, λ - und κ -Kette untersucht. Außerdem wurde eine Antiserum gegen normales Humanserum verwendet (Abb. 3).

Am anodalen Ende des Präzipitationsbogens, der sich zwischen Serum und anti-NHS-Serum bildete, ließ sich eine Aufspaltung der Präzipitationslinie des IgG deutlich erkennen. Neben einer kontinuierlichen Weiterführung des Präzipitationsbogens, sah man einen zur Antiserumrinne hin gebogenen konvexen Ast, der sich in einer Linie mit partieller Identität von diesem abzweigte. Da diese Linie auf partielle Identität auch gegen ein anti- κ -Serum auftrat, nicht jedoch gegen eines der anderen Antiseren (nicht dargestellt), handelte es sich hier um eine M-Komponente vom IgG- κ -Typ.

Im Urin fand sich eine Leichtkette von eingeschränkter Heterogenität. Auch dabei erfolgte keine Reaktion gegen die anti- α , anti- μ , anti- γ und anti- λ -Seren (nicht dargestellt). Lediglich gegen das anti-NHS- und gegen das anti- κ -Serum bildete sich eine Präzipitationslinie. Es handelte sich also um ein κ -Bence-Jones-Protein.

Es war somit der Nachweis eines IgG- κ -Myeloms mit Bence-Jones-Proteinurie einer κ -Leichtkette erbracht.

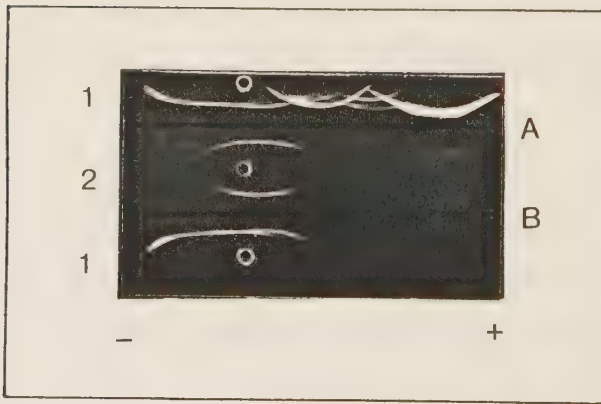


Abb. 3:

Immunoelektrophorese von Serum und Urin der Patientin MEV.
Nachweis eines IgG- κ -Myelom-Proteins und eines Bence-Jones-Proteins.

1 = Patientenserum, 1 : 2 verdünnt

2 = Urinproteine (Ammoniumsulfatfällung, siehe IV.1.1)

A = Antiserum gegen Humanserum (Herstellung siehe III.2.1)

B = Antiserum gegen κ -freie Leichtkette (Herstellung siehe IV.5.1)

1.3 Präoperative Auftrennung der Urinproteine

Die Auftrennung der Urinproteine zur Isolierung des BJP MEV durch die Zonenelektrophorese ergab drei Gipfel (Abb. 4):

Gipfel A wurde nicht weiter untersucht, da es sich wahrscheinlich um an der Auftragsstelle liegengebliebene Proteine handelte.

Gipfel B repräsentierte das BJP MEV, das mittels der Immundiffusion identifiziert wurde.

Gipfel C markierte die Albuminfraktion (Nachweis durch Immundiffusion). Da die Albuminfraktion relativ klein war, bestand bei der Patientin MEV zu diesem Zeitpunkt, etwa zwei Monate vor dem Tode, eine weitgehend ungestörte Nierenfunktion mit selektiver Bence-Jones-Proteinurie und nur geringer Albuminurie.

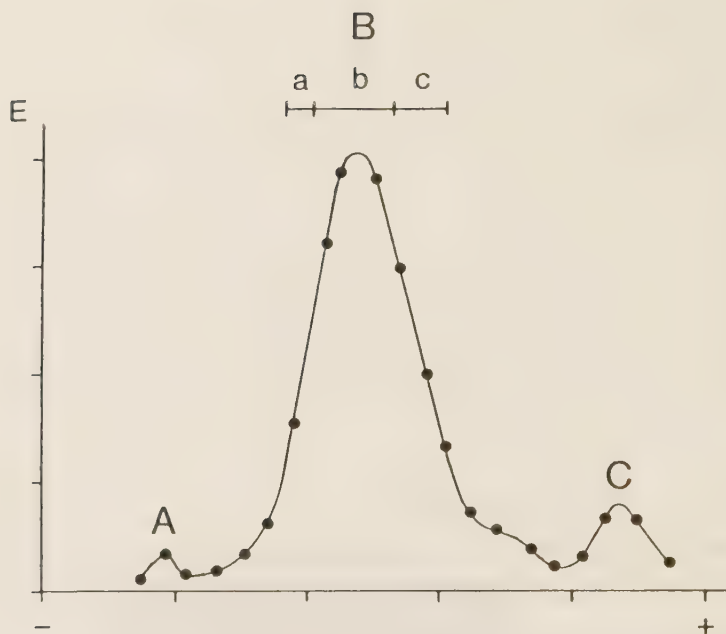


Abb. 4:

Auftrennung der Urinproteine der Patientin MEV mittels
Zonenelektrophorese.

A = liegengebliebene Proteine an der Auftragsstelle (nicht
näher untersucht)

B = BJP MEV (Hauptfraktion b, Nachbarfraktionen a und c)

C = Albumin

Die antigene Charakterisierung der Fraktionen B und C er-
folgte durch Immundiffusion (siehe IV.2).

2 Identifizierung des BJP MEV

Die in den Fraktionen der Zonenelektrophorese (siehe IV.1.3) vorhandenen Proteine wurden mit Hilfe der Immundiffusion identifiziert. Je eine Probe aus der Auftrennung wurde mit normalem Humanserum (1/2 verdünnt) und Albumin (5 mg/ml) nebeneinander aufgetragen. Als Antiserum wurde anti-Humanserum verwendet.

Die Probe aus Gipfel C der Zonenelektrophorese ergab eine einzige Präzipitationslinie gegen das anti-Humanserum, die kontinuierlich in die Präzipitationslinie des Albumins (d. h. Linie auf Identität) überging. Peak C repräsentierte also Albumin.

Die Probe aus Gipfel B zeigte gegen das anti-Humanserum eine einzige Präzipitationslinie. Diese stellte sich als Sporn einer etwa in der Mitte liegenden, stärkeren Präzipitationslinie zwischen Humanserum und anti-Humanserum dar. Mit dieser Linie, wahrscheinlich IgG, bestand also partielle Identität. Zur weiteren antigen Charakterisierung und zum Nachweis der Homogenität des Peaks B wurden Proben aus der Hauptfraktion b und den Nachbarfraktionen a und c (siehe Abbildung 4) des Gipfels B nebeneinander mit anti- α -GRI und anti-Humanserum aufgetragen. Es zeigte sich eine Linie auf Identität zwischen den drei Fraktionen bei beiden Antiseren. Damit war der Nachweis geführt, daß es sich bei Peak B um ein α -Bence-Jones-Protein handelte.

Zu Peak A wurde bereits Stellung genommen (siehe IV.1.3).

3 Limitierte Proteolyse von Bence-Jones-Proteinen

3.1 Verdauung von Bence-Jones-Proteinen unter verschiedenen Bedingungen

Vorversuche wurden mit mehreren Bence-Jones-Proteinen verschiedenen Isotyps durchgeführt, um ein geeignetes Bence-Jones-Protein für die weiteren Untersuchungen zu finden.

Zunächst wurde BJP MIT (λ III) und BJP GRI (κ I) verdaut, um erste Ergebnisse über das Verhalten von Bence-Jones-Proteinen unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten. Es wurde eine möglichst limitierte Proteolyse des eingesetzten Bence-Jones-Protein angestrebt, bei möglichst hoher Ausbeute an amyloidogenen Fragmenten, d. h. die Spaltung in kleine Peptide und einzelne Aminosäuren sollte möglichst vermieden werden. Folgende Variationen wurden gewählt:

Zunächst wurden BJP MIT und BJP GRI mit Trypsin (Rindertrypsin, 3,5 U/mg, Merck, Darmstadt) in verschiedener Konzentration (1/10 - 1/100, Protein : Enzym, Volumen : Volumen) bei 37° C und 55° C im Wasserbad verdaut. Die Konzentrationen der Bence-Jones-Proteine betrugen 5 - 20 mg/ml. Als Puffer wurde 0,05 M Tris in 0,9 % NaCl, pH 7,6, verwendet, der durch Titration mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf einen pH zwischen 6,5 und 8,2 eingestellt wurde. Die Einwirkungsdauer des Enzyms wurde zwischen 0 und 120 Minuten variiert.

Die Proteolyse wurde durch die Zugabe von Trypsin begonnen und durch Hinzufügen des Trypsininhibitors (Sigma, München) in der gleichen Konzentration wie Trypsin beendet. Die Probe wurde anschließend bei -20°C eingefroren.

Durch die Immunelektrophorese wurde das Ausmaß der Fragmentbildung anhand der Präzipitationslinien getestet.

Dabei wurde die Methode von Solomon und Mc Laughlin (1969) verwendet, die V- und C-Teil der Bence-Jones-Proteine mittels ihrer unterschiedlichen Ladung identifizierten. Da die variable Region (V-Teil) im allgemeinen saurer, die konstante Region (C-Teil) in der Regel alkalischer ist als das intakte Bence-Jones-Protein, ergibt die elektrophoretische Auftrennung nach limitierter Verdauung drei Präzipitationslinien: eine in der Mitte (ungefähr um die Auftragsstelle), die das intakte Bence-Jones-Protein repräsentiert, eine zur Anode verschobene (V-Teil) und eine zur Kathode verlagerte (C-Teil). Die mittlere Präzipitationslinie spornt dabei über die beiden äußeren. Diese Spornbildung ist Ausdruck des Verlustes von antigenen Determinanten der bei der Verdauung entstandenen Fragmente.

Die Kinetik der Entstehung der Bence-Jones-Protein-Fragmente wurde beispielhaft an einer limitierten Proteolyse in Abbildung 5 dargestellt. Variiert wurde die Zeit der Verdauung bei

sonst konstanten Bedingungen. Man sieht bei $t = 0$ nur die Präzipitationslinie des ungespaltenen Bence-Jones-Proteins; mit zunehmender Dauer der Verdauung wird diese schwächer, dafür entstehen zur Anode und zur Kathode hin verlagerte Präzipitationslinien, über die das Bence-Jones-Protein spornt. Diese Linien repräsentieren die zunehmende Bildung von V- und C-Fragmenten. Wird die Verdauung allerdings über 40 Minuten fortgesetzt, nehmen sowohl die Länge als auch die Stärke sämtlicher Präzipitationslinien wieder ab. Dabei verschwindet der C-Teil schneller als die Präzipitationslinien des Bence-Jones-Proteins und des V-Teils.

Als optimal wurde die Verdauung angesehen, die eine möglichst schwache Präzipitationslinie gegen das intakte Bence-Jones-Protein bei gleichzeitig möglichst starker Präzipitationslinie gegen den V-Teil zeigte. Dabei blieb die Präzipitationslinie des C-Teils unberücksichtigt (Tabellen 1 A und B).

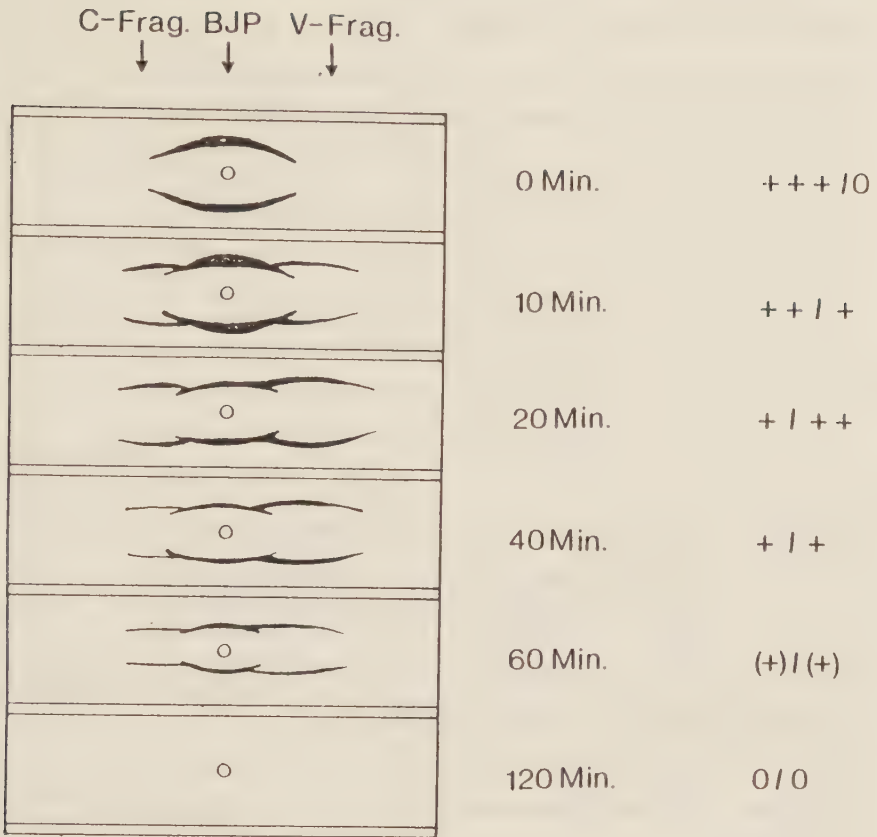


Abb. 5:

Kinetik der Entstehung von Bence-Jones-Protein-Fragmenten durch limitierte Proteolyse:

Die Identifizierung des Bence-Jones-Proteins und der V- und C-Teile geschieht durch die unterschiedliche Lage. Die Stärke der Präzipitationslinie zwischen Antiserum und C-Fragment blieb unberücksichtigt.

Schlüssel für die Abschätzung der Stärke der Präzipitationslinien siehe nächste Seite!

Schlüssel zur Abschätzung der Stärke der Präzipitationslinien für Abbildung 5, Tabellen 1 A und 1 B:

Stärke der Präzipitationslinie des Bence-Jones-Proteins/
Stärke der Präzipitationslinie des V-Fragments

Schlüssel: 0 keine Präzipitationslinie sichtbar
 (+) gerade noch sichtbare Linie
 + schwache Präzipitationslinie
 ++ deutliche Präzipitationslinie
 +++ starke Präzipitationslinie
 - nicht untersucht

Beispiel: (+)/++ heißt: gerade noch sichtbare Präzipitationslinie des Bence-Jones-Proteins bei deutlicher Präzipitationslinie des V-Fragments.

Tabellen 1 A und 1 B (nächste Seite):

Kinetik der limitierten Proteolyse bei BJP MEV unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Nachweis durch Immunelektrophorese).

Die optimalen Verdauungsbedingungen sind eingerahmt. Die Erklärung der Symbole siehe oben.

Tabelle 1 A:

Variation von Zeit, pH, Temperatur; Konstanten: Enzymkonzentration 1/20 der Proteinkonzentration, 10 mg Protein/ml.

Tabelle 1 B:

Variation von Enzymkonzentration, Zeit, Temperatur; Konstanten: pH 7,4, 10mg Protein/ml.

Tabelle 1 A:

Zeit (Min.)	37° C				55° C	
	pH 7,0	pH 7,4	pH 7,8	pH 8,2	pH 6,5	pH 7,0
0	+++ / 0	+++ / 0	+++ / 0	+++ / 0	-	-
10	+++ / 0	++ / +	++ / (+)	++ / (+)	+++ / 0	-
20	++ / (+)	+ / +	+ / 0	++ / 0	++ / +	0 / 0
30	+ / +	+ / ++	+ / +	+ / +	+ / 0	0 / 0
40	+ / +	(+) / ++	+ / +	+ / (+)	+ / 0	0 / 0
60	(+) / (+)	(+) / 0	+ / 0	(+) / 0	0 / 0	0 / 0
120	0 / 0	0 / 0	-	0 / 0	-	-

Tabelle 1 B:

Enzym- konz.	37° C		55° C	
	20 Min.	30 Min.	10 Min.	20 Min.
1/10	+ / 0	+ / 0	(+) / 0	(+) / 0
1/20	+ / +	+ / ++	+ / 0	+ / 0
1/25	+ / ++	+ / ++	+ / +	+ / 0
1/50	++ / +	++ / +	++ / (+)	++ / +
1/100	++ / 0	++ / 0	+++ / 0	+++ / 0

3.2 Auswahl eines Bence-Jones-Proteins

Aus den Vorversuchen mit den BJP MIT und GRI (siehe IV.3.1) ergab sich die größte Ausbeute an V-Fragment bei 37° C, pH 7,4, einer Inkubationszeit zwischen 30 und 40 Minuten und einer Enzymkonzentration von 1/25 bis 1/20 der Proteinkonzentration bei einer konstanten Proteinkonzentration von 10 mg/ml. Die gewonnene Menge an V-Fragment bei 55° C unter Variation der anderen Variablen war durchwegs geringer als bei 37° C. Aus den Ergebnissen der Vorversuche wurden folgende Versuchsbedingungen für eine Verdauungsreihe mit elf Bence-Jones-Proteinen festgelegt:

Proteinkonzentration 10 mg/ml, pH 7,4, Temperatur 37° C, Enzymkonzentration 1/20 der Proteinkonzentration, Verdauungszeit 30 Minuten (Tabelle 2).

Die Versuchsdurchführung entsprach dem bei den BJP MIT und GRI angegebenen Verfahren (siehe IV.3.1).

Nach dem Wiederauftauen wurde die Menge an gewonnenem Präzipitat abgeschätzt (Schlüssel siehe Legende zu Tab. 3, S. 44).

Anschließend wurden die Präzipitate auf Amyloid mit der Kongorotfärbung (siehe III.4) und der grünen Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop untersucht.

Tabelle 2:

Versuchsreihe mit 11 Bence-Jones-Proteinen zur Testung auf
Präzipitat und Amyloid:

Protein	Isotyp*	Präzipitat (Menge abge- schätzt)	Kongorot- färbung	grüne Doppel- brechung
CLE	λ I	++	nein	nein
HEN	λ I	+	ja	ja
MIT	λ III	-	nein	nein
ZIM	λ I	(+)	ja	ja
REI	λ ?	-	nein	nein
GRI	κ I	+	nein	nein
MEV	κ I	+++	ja	ja
GIN	κ III	-	nein	nein
KAE	κ ?	++	nein	nein
MUE	κ ?	+	nein	nein
ACK	κ ?	-	nein	nein

Bei BJP MEV ergab sich die größte Präzipitatsmenge bei po-
sitiver Kongorotprobe und grüner Doppelbrechung.

Schlüssel für die Abschätzung der Präzipitatsmenge Seite 38.

*Isotyp-Bestimmung: PD Dr. F. W. Tischendorf und Dr. M. Eulitz

Sieben Bence-Jones-Proteine bildeten ein Präzipitat, von denen sich drei mit Kongorot anfärben ließen und grüne Doppelbrechung zeigten.

Weitere Versuche konzentrierten sich auf das BJP MEV und seine Fragmente, da bei diesem Bence-Jones-Protein unter den Bedingungen, die bei der Verdauungsreihe (siehe Tabelle 2) angewandt worden sind, eine große Menge Präzipitat mit Amyloidkonformation entstand.

Für diese Wahl sprach auch, daß es sich beim BJP MEV um ein Bence-Jones-Protein von einer Patientin mit Amyloidose handelte, das vollständig sequenziert worden ist und das in größerer Menge zur Verfügung stand. Ein weiterer Vorteil dieses Proteins und seiner Fragmente lag in der elektrophoretischen Mobilität, da sich hier Bence-Jones-Protein, V- und C-Teil in der beschriebenen Weise (siehe IV.1.2) gut trennen und erkennen ließen.

3.3 Optimale Verdauung von BJP MEV

In den weiteren Versuchen wurden die schon durchgeführten limitierten Proteolysen speziell für das BJP MEV optimiert.

Da es sich bei der gewählten Temperatur (37°C) und dem pH (7,4) um physiologische Werte handelte, wurden diese belassen und nur noch die Enzymkonzentration (1/20 und 1/25, Enzym : Protein, Volumen : Volumen), Proteinkonzentration (5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml) und die Zeit (5 - 60 Minuten) engmaschiger als bisher variiert.

Die limitierten Proteolysen des BJP MEV ergaben die in Tabelle 3 wiedergegebenen Resultate. Danach wurden folgende Versuchsbedingungen als optimal (maximale Präzipitationsmenge) angesehen:

10 mg BJP MEV pro ml in 0,05 M Tris-HCl-Puffer mit 0,1 M NaCl bei pH 7,4 wurden mit Trypsin bei einem Enzym-Protein-Verhältnis von 1 : 20 (Gewicht/Gewicht) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Trypsininhibitor im Verhältnis 1 : 1 (Trypsin : Inhibitor) wurde die Verdauung gestoppt. Anschließend wurde der pH durch die Zugabe von konzentrierter Essigsäure (15 $\mu\text{l/ml}$) auf pH 4,0 gesenkt. Mehrfaches Einfrieren und langsames Auftauen ließ ein Präzipitat entstehen, dessen maximale Menge nach 3 - 4-maligem Durchführen der Prozedur erreicht war. Das Präzipitat wurde bei 5000 Umdrehungen/Minute für 30 Minuten abzentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus Christ, Osterode). Es folgte zweimaliges

Waschen des Präzipitats mit destilliertem Wasser, das mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt war. Überstand und Sediment wurden anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Tabelle 3:

Limitierte Proteolysen des BJP MEV zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen:

Zeit	5 mg		10 mg		20 mg	
	1/20	1/25	1/20	1/25	1/20	1/25
5	+	+	++	++	+	+
10	++	+	+++	++	+	+
20	+	+	++	+	++	++
40	+	(+)	+	+	+	+
60	(+)	(+)	+	+	+	+

Variation der Zeit, Protein- und Enzymkonzentration; Konstanten: pH 7,4, Temperatur 37° C. Bei einer Enzymkonzentration von 1/20 der Proteinkonzentration, 37° C und 10 Minuten Inkubationszeit zeigt sich eine maximale Ausbeute an Präzipitat (eingerahmt).

Schlüssel zur Abschätzung der Menge an Präzipitat für die Tabellen 2 und 3:

- kein Präzipitat
- (+) gerade noch sichtbares Präzipitat
- + wenig Präzipitat
- ++ mäßig viel Präzipitat
- +++ viel Präzipitat

3.4 Herstellung einer großen Menge von BJP MEV-Fragment mit Amyloidkonformation

Um eine große Menge Präzipitat aus BJP MEV zu gewinnen, wurden 240 mg BJP MEV der optimierten Verdauung unterzogen. Das hier verwendete BJP MEV stammt direkt aus der Ammoniumsulfatfällung. Da es sich wie schon gezeigt wurde (siehe Abb. 4), bei der Patientin MEV um eine fast reine Bence-Jones-Proteinurie mit nur sehr geringem Albuminanteil handelte, konnte auf eine präoperative Reinigung mittels Zonenelektrophorese verzichtet werden.

Eine Probe des gewonnenen Präzipitats wurde der Kongorotfärbung und anschließender Prüfung auf grüne Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop unterzogen. Beide Untersuchungen waren positiv, so daß das Präzipitat in vitro erzeugtes Amyloid enthalten mußte.

4 Auftrennung der BJP MEV-Fragmente

Die Auftrennung mittels Gelfiltration ergab vier Peaks: Peak A enthielt Albumin, Peak B unverdautes BJP MEV, Peak C amyloidogenes V-Fragment von BJP MEV, Peak D den Marker der Salzfraction N- ϵ -DNP-Lysin (Abbildung 6).

Die Größenbestimmung der Proteinfractionen ergab für Peak A 66 000 d, für Peak B 23 000 d und für Peak C 11 000 d (Abb. 7).

In Übereinstimmung mit den ermittelten Molekulargewichten konnte mit Hilfe der Immundiffusion (siehe IV.2) Peak A als Albuminfraction und Peak B als intaktes BJP MEV identifiziert werden.

Der antigene Charakter der Hauptfraction C wurde durch Immundiffusion (siehe IV.5.2) näher untersucht. Auf Grund der folgenden Resultate und des schon gezeigten amyloidogenen Charakters (siehe IV.3.4) wird in den folgenden Kapiteln das amyloidogene Fragment des BJP MEV auch als "Amyloid" MEV oder "A" MEV bezeichnet.*

*Unter Amyloid oder amyloidogenem Protein versteht man in vivo während eines Krankheitsprozesses entstandene fibrilläre Proteinablagerungen mit Amyloidkonformation (siehe I). Unter amyloidähnlichen Proteinen oder "Amyloid" versteht man in vitro durch Manipulation entstandene fibrilläre Ablagerungen mit Amyloidcharakter. Aus diesem Grunde wird das aus BJP MEV in vitro erzeugte Produkt in Anführungszeichen geschrieben: "Amyloid" MEV oder "A" MEV.

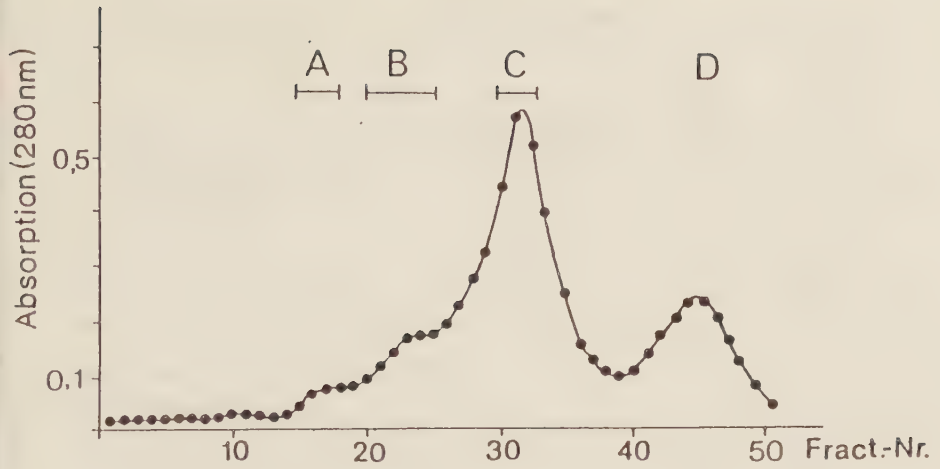


Abb. 6:

Gelchromatographische Auftrennung der durch limitierte Proteolyse gewonnenen Fragmente. Die Balken repräsentieren die untersuchten Fraktionen.

A = Albumin

B = unverdautes BJP MEV

C = amyloidogenes Fragment des BJP MEV

D = Salzmarker

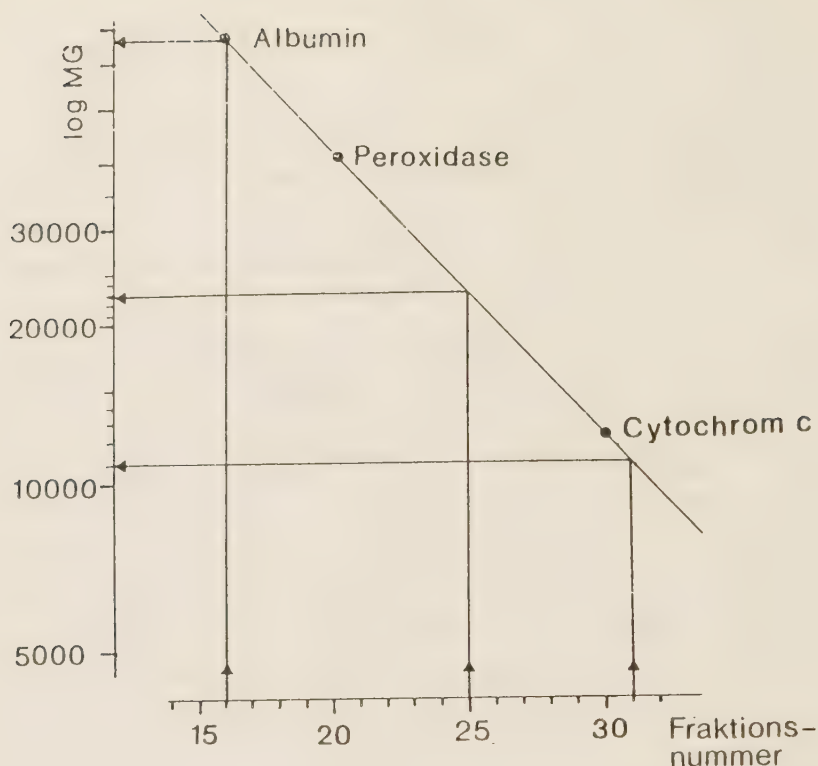


Abb. 7:

Molekulargewichtsbestimmung der durch die Gelchromatographie gewonnenen Fraktionen.

Aufgrund des linearen Verhältnisses zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Nummer des Röhrchens, in welchem sich die Hauptmenge der jeweiligen Proteinfraction befindet, läßt sich das Molekulargewicht zeichnerisch ermitteln:

Fraktionsnummer 16 für Peak A: 66 000 d (Albumin)

Fraktionsnummer 25 für Peak B: 23 000 d (BJP MEV)

Fraktionsnummer 31 für Peak C: 11 000 d (amyloidogenes Fragment des BJP MEV, Nachweis siehe IV.5.2)

5 Charakterisierung der amyloidbildenden Fibrillen

5.1 Antiseren gegen den variablen und den konstanten Teil des BJP MEV

Zum Verständnis der Spezifität der verwendeten Antiseren ist die Kenntnis der antigenen Struktur der Bence-Jones-Proteine und speziell des κ -BJP MEV notwendig. Das κ -BJP MEV ist ein aus 214 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einem N-terminalen variablen Teil und einem C-terminalen konstanten Teil, wobei beide Teile etwa gleich groß sind. Das von der Patientin MEV isolierte Fibrillenprotein MEV ist ein Bruchstück des variablen Teils des intakten BJP MEV. Es beginnt mit der N-terminalen Aminosäure Asp und erstreckt sich ungefähr bis zur Aminosäure an Position 92 (Eulitz und Linke, 1982; siehe auch IV.5.4).

Ein aus dem BJP MEV gewonnenes Antiserum reagiert gegen die antigenen Strukturen sowohl des konstanten Teils (C-Teil) als auch des variablen Teils (V-Teil). Da die antigenen Strukturen des C-Teils bei allen κ -Bence-Jones-Proteinen im wesentlichen die gleichen sind, kreuzreagieren alle anti- κ -Serum mit allen Bence-Jones-Proteinen über den C-Teil. Die antigenen Strukturen des V-Teils setzen sich aus subgruppenspezifischen und idiotypischen (hypervariable Region) Strukturen zusammen. Das BJP MEV gehört der κ I-Subklasse an und wird deshalb mit V-Teilen von κ I-Bence-Jones-Proteinen kreuzreagieren. Dagegen ist die Reaktion mit dem Idiotyp auf das BJP MEV beschränkt und hat gewöhnlich keine Kreuzreaktion mit anderen κ -Bence-Jones-Proteinen.

Ein Antiserum gegen den C-Teil wird demgemäß ein anti- α -Serum sein, das aus einem α -Bence-Jones-Protein erzeugt wurde, welches nicht der V α I-Subgruppe angehört. Daher wurde als anti-C-Reagenz ein Serum verwendet, das aus BJP KOC, einem α IV-BJP gewonnen wurde (Subgruppenbestimmung siehe Danksagung).

Ein Antiserum gegen den V-Teil des BJP MEV wurde hergestellt, indem bei einem aus dem BJP MEV gewonnenen Antiserum die gegen den C-Teil gerichteten Strukturen durch V α III-BJP NYM absorbiert worden sind. Das so erzeugte Antiserum erkennt nunmehr nur noch die subgruppenspezifischen und idiotypischen antigenen Strukturen des V-Teils.

5.2 Nachweis der antigenen Spezifität

Das aus der Gelchromatographie gewonnene MEV-Fragment (synonym auch "A" MEV genannt) und das intakte BJP MEV (aus der Zonenelektrophorese) wurden mit der Immundiffusion auf ihre antigene Spezifität untersucht (Abb. 8 A, B, C).

Als Antiseren wurden ein Antiserum gegen den V- und gegen den C-Teil des BJP MEV (anti- α I BJP MEV = anti-V+C), ein Antiserum gegen den C-Teil von BJP MEV (anti- α IV BJP KOC = anti-C) und ein Antiserum gegen den V-Teil von BJP MEV (anti- α I BJP MEV absorbiert mit α III BJP NYM = anti-V) verwendet.

Zwischen dem anti-V+C-Serum und BJP MEV zeigte sich eine Präzipitationsdoppellinie, wobei sich die innere Linie kontinuierlich in die Linie gegen "A" MEV fortsetzte (Abb. 8 A).

Gegen das anti-C-Serum bildete sich nur beim BJP MEV eine Präzipitationslinie, jedoch nicht gegen "A" MEV (Abb. 8 B).

Bei Verwendung eines anti-V-Serums zeigte sich eine Präzipitationslinie, die kontinuierlich, d. h. auf Identität, gegen das BJP MEV und "A" MEV ohne Spornbildung verläuft (Abb. 8 C).

Abb. 8 A, B und C (nächste Seite):

Immundiffusion zum Vergleich der antigenen Spezifität zwischen dem intakten BJP MEV und "A" MEV.

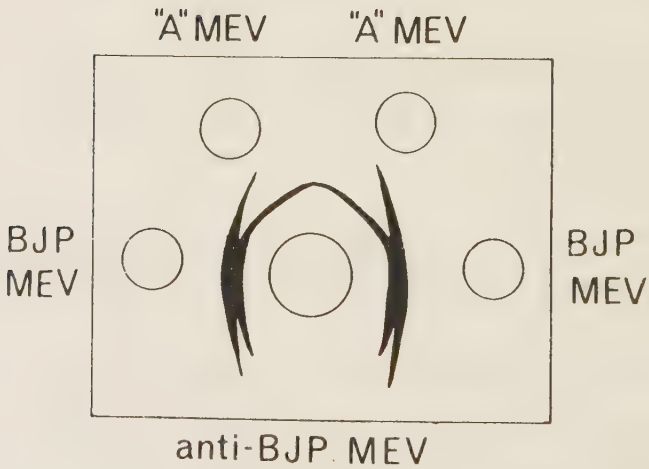
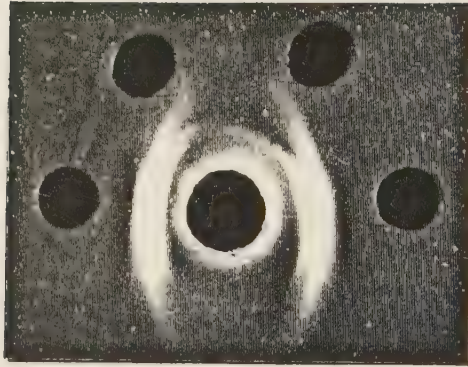


Abb. 8 A:

Die Verwendung eines anti-BJP MEV-Serums zeigt sich eine Linie auf partielle Identität des "A" MEV mit BJP MEV.

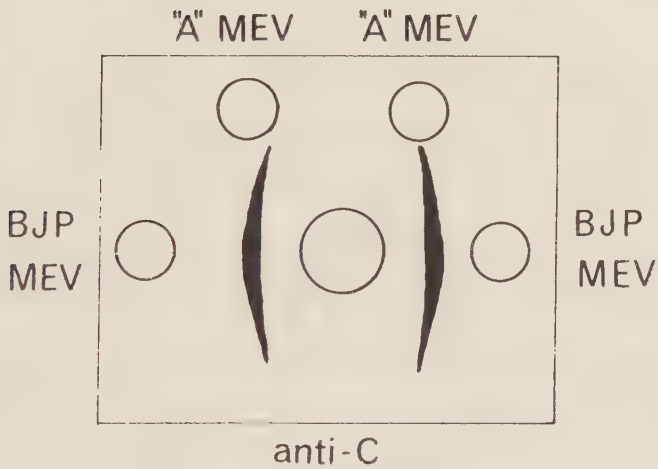
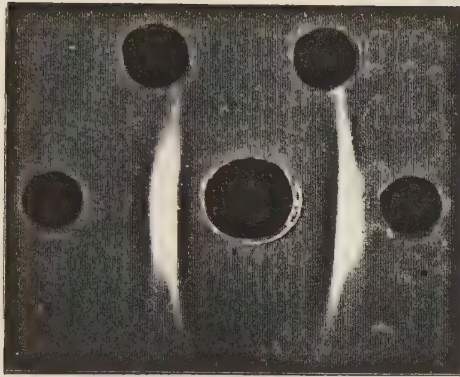


Abb. 3 B:

Gegen ein anti-C-Serum bildet sich gegen "A" MEV keine Präzipitationslinie.

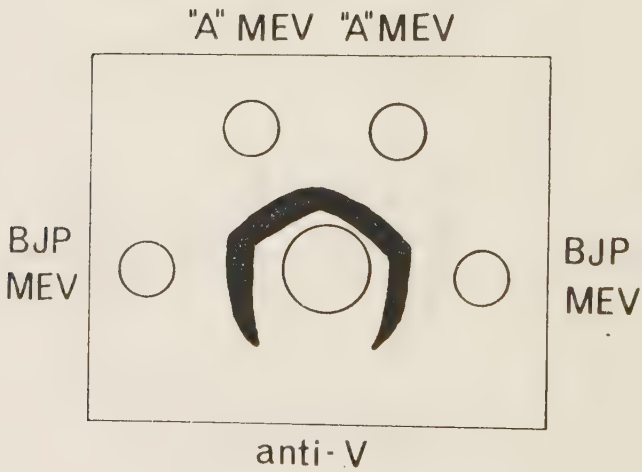
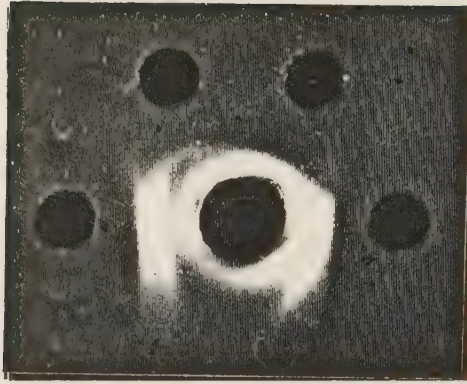


Abb. 8 C:

Mit einem anti-V-Serum ergibt sich eine Linie auf Identität zwischen "A" MEV und BJP MEV.

Aus den Resultaten der Immundiffusion ergab sich:

"A" MEV besteht aufgrund der fehlenden Reaktion mit dem anti-C-Serum und gleichzeitiger Präzipitationslinie gegen das anti-V-Serum und das anti-BJP MEV-Serum aus dem V-Teil des BJP MEV.

Wegen der Linie auf Identität mit BJP MEV bei Verwendung eines anti-V-Serums muß "A" MEV (in Übereinstimmung mit dem ermittelten Molekulargewicht von 11 000 d, das etwa der Größe des kompletten V-Teils entspricht) aus (nahezu) dem gesamten V-Teil des BJP MEV bestehen. Damit ist auch die Linie auf partielle Identität mit BJP MEV gegen das anti-BJP MEV-Serum erklärt.

Somit ist nachgewiesen, daß es sich bei "A" MEV um den (fast) kompletten V-Teil des BJP MEV handelt. Der amyloidogene Charakter wurde bereits gezeigt (siehe IV.4).

5.3 Größenbestimmung des amyloidogenen Fragments

Das aus der Gelchromatographie gewonnene amyloidogene Fragment des BJP MEV wurde auch einer Größenbestimmung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Es zeigte sich ein Molekulargewicht zwischen 10 000 und 12 000 d. Dieses Ergebnis stimmt mit der bei der Gelchromatographie vorgenommenen Größenbestimmung überein (11 000 d).

Darüber hinaus zeigte die Polyacrylamidgelelektrophorese keine weitere Proteinbande. Das Fragment lag also in reiner Form vor, was auch durch die Immundiffusion bestätigt werden konnte (siehe IV.2).

5.4 Aminosäuresequenz von BJP MEV und Amyloid MEV

Die Aminosäuresequenz des BJP MEV und die des Amyloids MEV sind publiziert worden (Eulitz und Linke, 1982).

Die ersten 14 Aminosäuren des BJP MEV sind wie folgt:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Asp	Val	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser

Das BJP MEV gehört der κ -I-Subgruppe an. Es sind zwei Formen des BJP MEV gefunden worden, wobei die eine mit Asparaginsäure in Position 1, dem für diese Subgruppe typischen N-Terminus, begann, während die zweite Form mit Position 4 (Methionin) begann. Das Fehlen des N-terminalen Tripeptids wurde möglicherweise durch Proteinasen des Urins verursacht. Es wurde ferner an der Verbindungsstelle zwischen V- und J-Gen (nach Position 95) eine zusätzliche Aminosäure (Glutaminsäure) gefunden. Auch weicht die Sequenz der J-Region des BJP MEV von schon bekannten Sequenzen humaner κ -J-Genen ab, was möglicherweise auf eine ungewöhnliche Verbindung von dem J- und dem C-Exon zurückzuführen ist.

Die Aminosäuresequenz des Amyloidfibrillenproteins (Λ MEV) wurde bis zur Position 27 bestimmt. Sie entsprach völlig der Sequenz der mit Asparaginsäure beginnenden Form des BJP MEV. Die Tatsache, daß das im Extrazellulärraum abgeschiedene Amyloid vollständig ist, ist ein weiterer Hinweis, daß die Entfernung des N-terminalen Tripeptids möglicherweise im Urin erfolgt. Die Größe des Amyloidfibrillenproteins lag zwischen 11 000 und 12 000 d.

5.5 N-terminale Aminosäuresequenz des In-vitro-Amyloids MEV

Die N-terminale Aminosäuresequenz des amyloidogenen MEV-Fragments, das nach In-vitro-Bildung durch Gelchromatographie (siehe IV.4) isoliert wurde, lautet für die ersten 4 Aminosäuren:

1 2 3 4

Asp-Val-Gln-Met-

Neben dieser Hauptsequenz fand sich in geringer Konzentration eine andere Sequenz mit folgenden vier Aminosäuren:

70 71 72 73

Asp-Phe-()-Thr-

Dabei konnte die dritte Aminosäure dieser Folge nicht sicher bestimmt werden.

Vergleicht man diese Sequenz mit der des V-Teils bzw. mit der des Amyloids von MEV, so findet man, daß es sich um die Positionen 70 bis 74 handelt. Die Aminosäuresequenz der Hauptsequenz ist dagegen identisch mit den ersten 4 Aminosäuren des N-terminalen Endes von A α MEV bzw. des V-Teils des BJP MEV.

Neben einer Spaltung des V-Teils des BJP MEV ungefähr bei Position 100 (dies entspricht dem amyloidogenen MEV-Fragment mit dem Molekulargewicht von etwa 12 000 Dalton) scheint es also in geringem Umfang auch zu einer Spaltung vor Position 70 gekommen zu sein (Abb. 9).

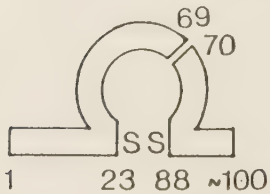
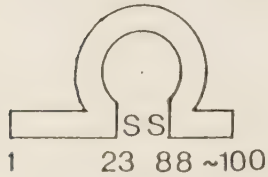
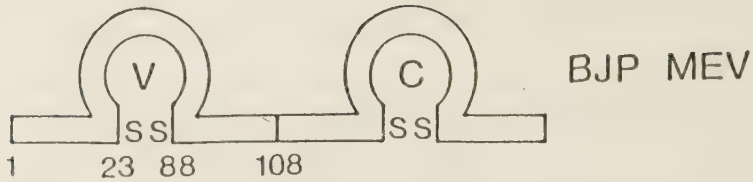


Abb. 9:

N-terminale Aminosäuresequenz des In-vitro-Amyloids MEV.

Die Abbildung zeigt ein graphisches Modell des intakten BJP MEV sowie die des amyloidogenen MEV-Fragments. Diese Fragment liegt in zwei Formen vor: Die Hauptsequenz repräsentiert das N-terminale Ende des V-Teils des BJP MEV bis etwa zur Position 100 reichend. Die Nebensequenz stellt den Beginn einer zusätzlichen Spaltungsstelle an Position 70 dar. Durch die Disulfidbrückenbindung ist diese Nebensequenz trotzdem mit dem N-terminalen Ende verbunden.

6 Bestimmung der Hydrophobizität des BJP MEV und seines Fragments

Die Charge-Shift-Elektrophorese beruht auf der Beobachtung, daß amphiphile (im Gegensatz zu hydrophilen) Proteine große Mengen nicht geladener Detergenzien binden. Werden nun zusätzlich geladenen Detergenzien (CTAB negativ, DOC positiv geladen) in geringer Menge zugegeben, bilden sich negativ bzw. positiv geladene Micellen, die um so mehr gebunden werden, je hydrophober ein Protein ist. Dementsprechend verändert sich die Ladung und damit die elektrophoretische Mobilität eines Proteins.

Die Differenz zwischen der Mobilität ohne geladene Detergenzien und der Mobilität mit geladenen Detergenzien bezeichnet man als Charge-Shift. Die Stärke des Charge-Shifts kann als Kriterium für das Ausmaß der Hydrophobizität gewertet werden. Damit kann auch die Veränderung der Hydrophobizität bzw. Hydrophilität gemessen werden.

Wird beispielsweise der hydrophile Teil eines amphiphilen Proteins entfernt, so wird der Charge-Shift zunehmen, umgekehrt wird der Verlust des hydrophoben Teils eines amphiphilen Proteins zu einem kleineren Charge-Shift führen. Werden durch limitierte Proteolyse Bence-Jones-Proteine in Fragmente gespalten, so werden diese Fragmente gegenüber ihrem Ausgangsprotein durch Verlust von hydrophilen bzw. hydrophoben Teilen einen kleineren bzw. größeren Charge-Shift aufweisen. Dieses Prinzip wurde zur Untersuchung von BJP MEV und seines amyloidogenen Fragments herangezogen.

Zur Untersuchung der Hydrophobizität von nativem BJP MEV und "A" μ MEV wurde eine Charge-Shift-Elektrophorese durchgeführt. Zum Vergleich wurden zwei weitere κ -Bence-Jones-Proteine, BJP GRI und BJP HAN, das Amyloidprotein einer λ -Leichtkette, AL λ ULI, sowie als Kontroll- bzw. Referenzproteine, Transferrin und Albumin derselben Charge-Shift-Elektrophorese unterzogen.

Das BJP MEV stammt aus der Ammoniumsulfatfällung, während das "A" μ MEV aus der gelchromatographischen Auftrennung verwendet wurde.

Als Referenzprotein diente Albumin, da sich dieses aufgrund schneller anodaler Mobilität und geringem Charge-Shift gut als Bezugsprotein eignet. Die Wanderungsstrecken der anderen Proteine wurden in Prozent der Albuminwanderungsstrecke im jeweiligen Puffer (in Triton X-100 ohne geladenes Detergenz, in Triton X-100 und Natriumdeoxycholat oder in Triton X-100 und Cetyltrimethylammoniumbromid) ausgedrückt (Linke, 1981).

Als Kontrollprotein wurde Transferrin verwendet. Transferrin zeigt als beinahe reines hydrophiles Protein einen sehr geringen Charge-Shift bei mäßig schneller anodaler Mobilität. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Für die Bence-Jones-Proteine MEV, GRI und HAN ergaben sich individuelle Wanderungsstrecken, jedoch in jedem Fall einen mäßigen Charge-Shift als Ausdruck der mäßigen Hydrophobizität.

Dagegen zeigte sich bei "A" MEV und AL λ ULI ein deutlich größerer Charge-Shift.

Vergleicht man den Charge-Shift des BJP MEV mit dem seines Fragments "A" MEV, so wird eine erhebliche Zunahme deutlich. Das amyloidogene Fragment muß demnach eine wesentlich größere Hydrophobizität besitzen (Abb. 10, 11 A und B).

Während bei allen anderen Proteinen die Wanderungsstrecken in CTAB immer kleiner sind als die in DOC ist es bei Transferrin umgekehrt: die Wanderungsstrecke in DOC ist hier geringer als in CTAB (bezogen auf die Wanderungsstrecke von Albumin in %). Die Wanderungsstrecke in ungeladenen Detergenzien liegt in jedem Fall dazwischen. Dieser sogenannte "paradoxe Charge-Shift" bei Transferrin erklärt sich durch den geringen Anteil von hydrophoben Regionen im Vergleich mit Albumin, so daß die Zunahme der Wanderungsstrecke mit positiv geladenen Detergenzien relativ geringer ausfällt. Diese Tatsache kann somit auch als Kontrolle für die Richtigkeit der Ergebnisse gewertet werden.

Tabelle 4:

Charge-Shift Elektrophorese von BJP MEV und seinem amylo-
idogenen Fragment "A" MEV.

Protein	Puffer*		
	CTAB		DOC
Transferrin	39	35	31
BJP MEV	21	26	35
BJP GRI	50	56	69
BJP HAN	16	25	40
"A" MEV	8	36	69
ALAULI	-5	40	73

Die Werte sind in % Wanderungsstrecke von Albumin angegeben, wobei die Position von Albumin als +100 % festgesetzt wurde, wie in Abbildung 11 A illustriert.

*Alle Proteine wurden in 0,03 M Barbitalpuffer pH 8,6 und 5 g Triton X-100/l im elektrischen Feld aufgetrennt. In der mittleren Spalte ohne Zusatz eines geladenen Detergenz, in der linken Spalte mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), in der rechten Spalte mit Natriumdeoxycholat (DOC).

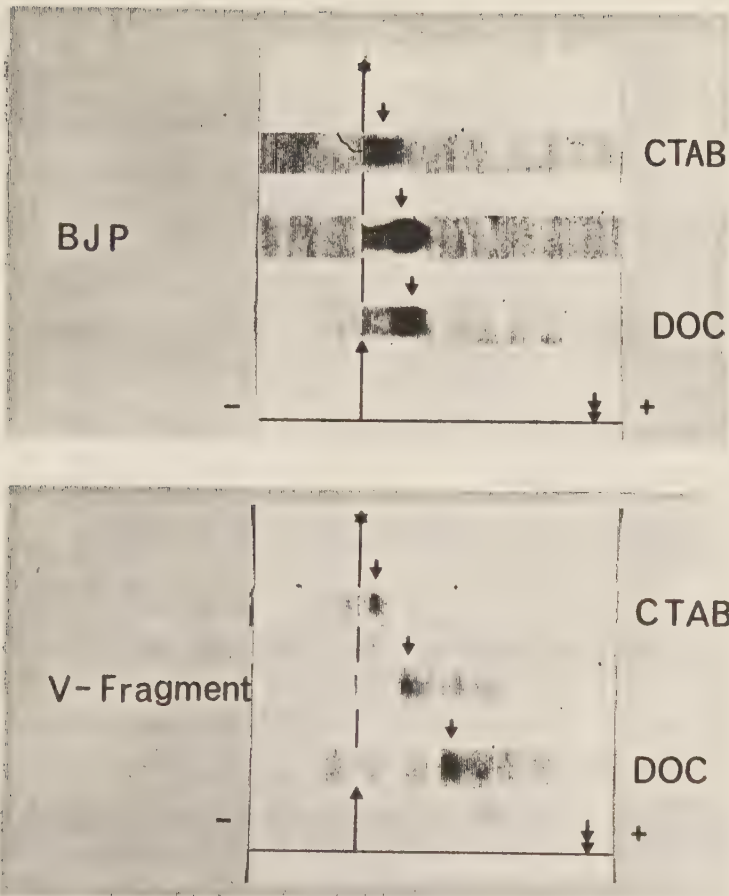


Abb. 10:

Charge-Shift-Elektrophorese. Vergleich von BJP MEV und seinem amyloidogenen Fragment.

* Auftragsstelle (Referenzpunkt = 0)

↓ Position von Albumin in Barbitarpuffer (Referenzpunkt = 100)

Die Proteine wurden in Agarose aufgetrennt und mit Pikrinsäure gefärbt.

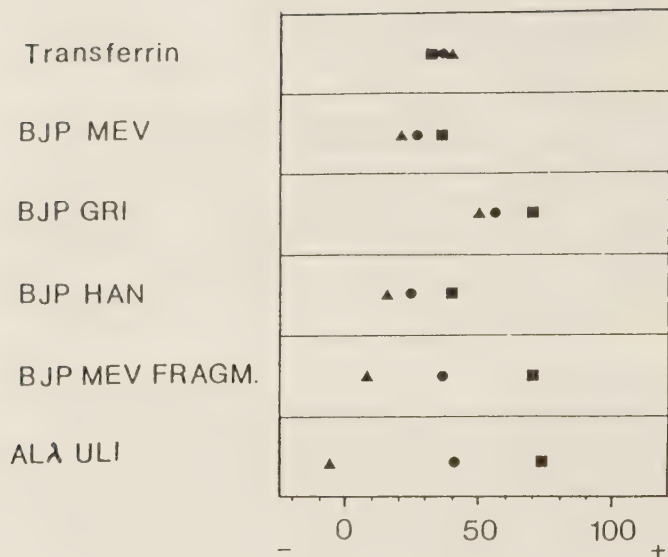


Abb. 11 A:

Graphische Darstellung der Wanderungsstrecken verschiedener Proteine in % Albuminwanderungsstrecke.

Zeichenerklärung:

- ▲ Cetyltrimethylammoniumsulfat (CTAB)
- ohne geladene Detergenzien
- Natriumdeoxycholat (DOC)

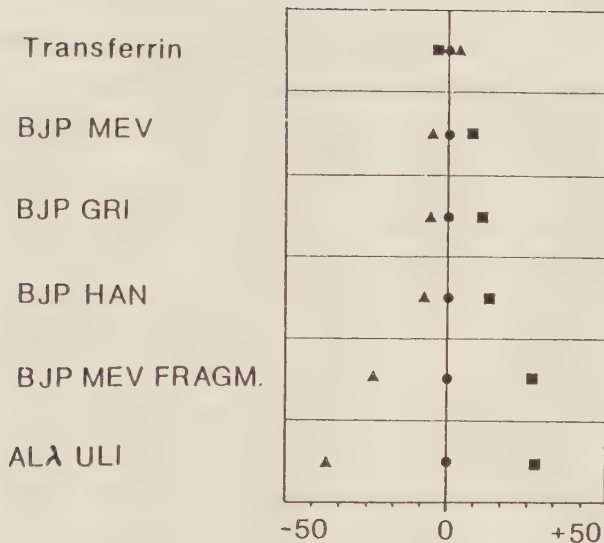


Abb. 11 B:

Um den unterschiedlichen Charge-Shift zu veranschaulichen, ist hier die Wanderungsstrecke (in % Albuminwanderungsstrecke) der Proteine in Barbitalspuffer als Bezugspunkt dargestellt.

Zeichenerklärung siehe vorhergehende Seite.

7 Elektronenoptische Morphologie

Wesentliche Erkenntnisse über die Morphologie der Amyloidfibrillen sind der Elektronenmikroskopie zu verdanken. So wurden durch Ladewig, 1943, Missmahl und Hartwig, 1953, und Romhanyi, 1956, die submikroskopischen gerichteten Strukturen in Amyloidablagerungen mit Hilfe des polarisierten Lichts vorhergesagt und damit die von Virchow 1853 lichtoptisch sichtbare postulierte Homogenität der Amyloidablagerungen durch genaue Kenntnisse der Feinstruktur erweitert. 1959 konnte durch Cohen und Calkins erstmals die fibrilläre Struktur von Amyloiden elektronenmikroskopisch gezeigt werden. Bis heute ist die Fibrillennatur in allen bisher untersuchten Amyloiden ohne Ausnahme bestätigt und gilt als eines der wesentlichen drei Kennzeichen von Amyloid. Auch bei den künstlich hergestellten Amyloiden konnte elektronenoptisch der Fibrillenaufbau nachgewiesen werden (Glenner et al., 1971; Linke et al., 1973; Shirahama et al, 1973).

Auch das aus der limitierten Proteolyse gewonnene Präzipitat von BJP MEV, das sich mit Kongorot anfärben ließ und grüne Doppelbrechung zeigte, wurde elektronenoptisch untersucht.

Die elektronenoptische Untersuchung zum Nachweis des fibrillären Aufbaus erbrachte die in den Abbildungen 12, 13 A, B dargestellten Resultate: Es läßt sich deutlich die Fibril-

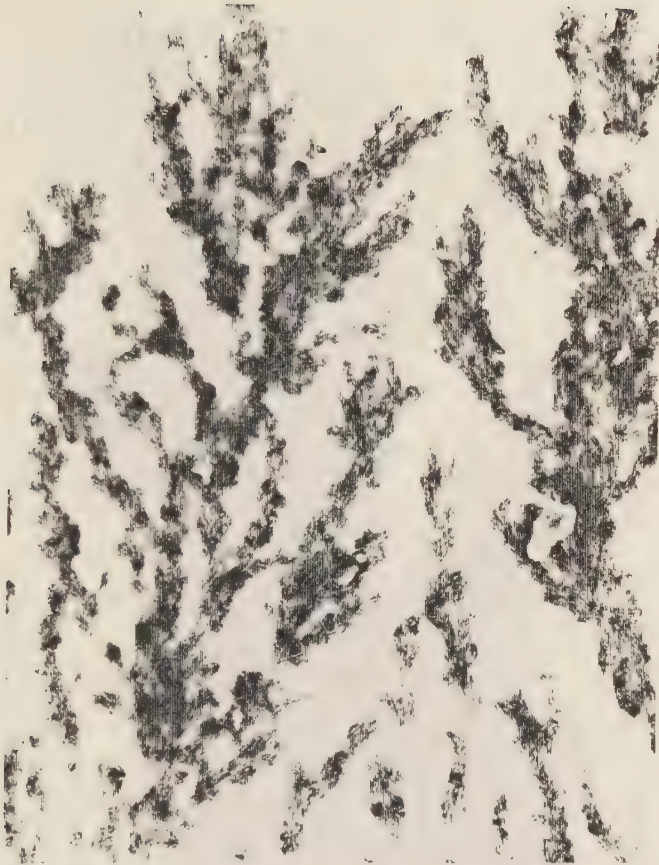


Abb. 12

Abb. 12 und 13 A, B:

Elektronenoptische Darstellung des In-vitro-Amyloids MEV.

Negativkontrastdarstellung mit Phosphorwolframsäure.

Abb. 12:

Die Übersichtsaufnahme zeigt das baumartige "Wachstum" der Fibrillen (Abbildungsmaßstab 15 000 : 1).



Abb. 13 A:

Darstellung eines Fibrillenastes. Man sieht deutlich einzelne Fibrillen (Abbildungsmaßstab 37 500 : 1).

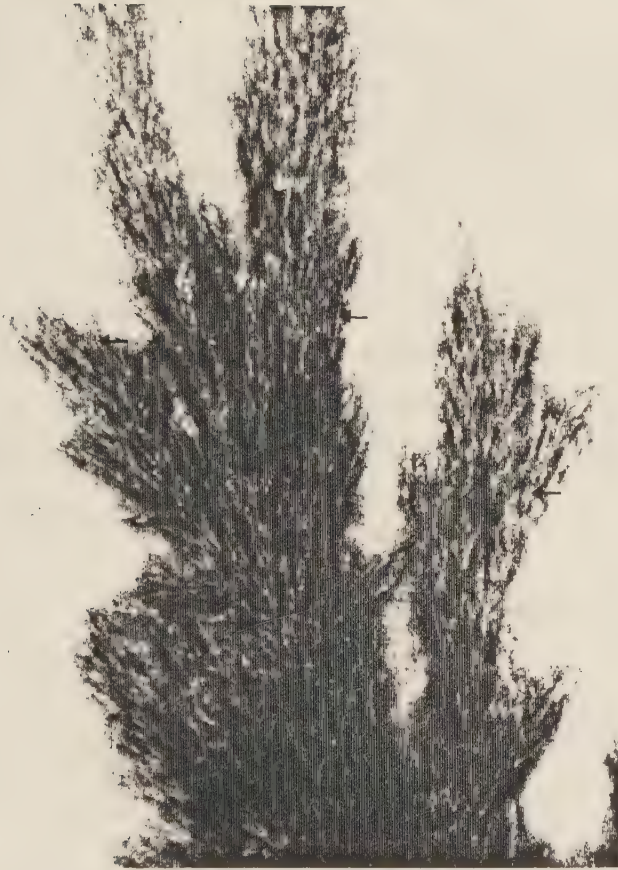


Abb. 13 B:

Ausschnittsvergrößerung von Abb. 13 A. Die Pfeile (→) deuten auf Stellen, wo Doppelfibrillen erkennbar sind (Abbildungsmaßstab 112 500 : 1).

lenstruktur erkennen. Zum Teil sind Doppelfibrillen sichtbar (Abb. 13 B, Pfeile). Die Fibrillen sind in Bündeln angeordnet. Sie weisen einen Querschnitt von etwa 100 Å auf. In der Übersichtsaufnahme (Abb. 12) sieht man eine baumartige Struktur, die durch die seitliche Aggregation von Fibrillen hervorgerufen wird.

Diese Befunde sind typisch für alle Amyloide, da sie bei sämtlichen bisher elektronenoptisch untersuchten Amyloidfibrillen gefunden werden konnten. Eine Unterscheidung zwischen natürlich vorkommenden und im Reagenzglas erzeugten Amyloiden ist deshalb elektronenoptisch nicht möglich.

In dieser Arbeit sollen Bedingungen gefunden werden, unter denen sich aus Bence-Jones-Proteinen von Patienten mit Amyloidose Amyloidfibrillen in vitro erzeugen lassen.

Diese Amyloidfibrillen sollen dann näher auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Unter welchen Bedingungen gelingt es, ein Bence-Jones-Protein von einem Patienten mit Amyloidose, amyloidogene Fragmente zu erzeugen?
2. Welche antigenen Eigenschaften haben diese Fibrillen in Relation zum Ausgangs-Bence-Jones-Protein?
3. Welche Größe und chemische Struktur hat dieses amyloid-erzeugende Fragment im Vergleich zum Bence-Jones-Protein?
4. Ändert sich die Hydrophobizität und damit die Löslichkeit des Fragments?
5. Wie sehen diese Fibrillen im Vergleich zu nativen Amyloidfibrillen im Elektronenmikroskop aus?

II FALLBESCHREIBUNG

Da die wesentlichen Untersuchungen am BJP MEV vorgenommen wurden, soll die Patientin, von der dieses Bence-Jones-Protein stammt, vorgestellt werden.

Erste Krankheitszeichen zeigten sich bei der damals 45-jährigen, aus Jugoslawien stammenden Patientin MEV in Form von Rückenschmerzen der Brust- und Lendenwirbelsäule. Zwei Jahre später erfolgte deshalb eine erste stationäre Aufnahme. Anlässlich einer Beckenkammpunktion wurde der Verdacht auf ein Plasmozytom geäußert. Der Röntgenbefund des Herzens zeigte eine leichte Linksbetonung, aber noch im Normbereich liegend.

Bei einer Kontrolle ein Jahr später, wurde eine Herzvergrößerung festgestellt, die im weiteren Verlauf noch erheblich zunahm. Das EKG zeigte beim ersten Krankenhausaufenthalt einen Indifferenztyp, der nun in einen Linkstyp übergegangen war. Die Endstrecken waren noch ohne Schädigungszeichen. Zwei Monate vor dem Exitus, sechs Jahre nach der ersten stationären Aufnahme, traten muldenförmige ST-Senkungen linkspräcordial, R-Verlust von V_1 bis V_4 und schließlich, noch einen Monat später, ein Wechsel vom Sinusrhythmus in eine absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern mit gleichzeitiger typischer peripherer Niedervoltage und Endstreckenveränderungen auf.

Bemerkenswert ist ferner, daß von BJP MIT und BJP GRI, die für die Vorversuche verwendet wurden, keine Präzipitate gewonnen werden konnten. Das mag daran liegen, daß die Versuchsbedingungen für diese Bence-Jones-Proteine nicht amyloidogen waren. Diese Annahme ist vor allem aus dem Grunde berechtigt, da wenigstens das BJP GRI von einem Patienten mit Amyloidose stammte (für BJP MIT nicht bekannt).

Von den 3 Bence-Jones-Proteinen, deren Präzipitate Amyloidcharakter aufwiesen, gehörten 2 dem λ -Isotyp an. Davon hatte eines die V λ I-Subgruppe. Die Subgruppe des anderen Bence-Jones Proteins ist nicht bekannt. Das dritte Präzipitat stammte von BJP MEV mit dem V λ I-Isotyp.

Bisherige limitierte Proteolysen mit Pepsin ergaben bei einigen Bence-Jones-Proteinen Präzipitate, die alle Amyloidkriterien erfüllten (Glenner et al., 1971). Weitergehende Untersuchungen an einer großen Zahl von verschiedenen Bence-Jones-Proteinen mit Pepsin zeigten bei der Bildung von In-vitro-Amyloiden eine Bevorzugung des λ -Isotyps und innerhalb dieses Isotyps eine Präferenz für die V λ I-Subgruppe (Linke et al., 1973).

Im Gegensatz dazu kommen bei In-vivo-Amyloiden unterschiedliche Subgruppen vor, wie an einer Reihe von natürlichen Amyloiden bzw. an Bence-Jones-Proteinen von Patienten mit Amyloidose in den letzten Jahren gezeigt werden konnte (Sletten et

al., 1974; Sletten et al., 1981; Sletten et al., 1983; Sletten et al., 1986; Takahashi et al., 1980; Toft et al., 1985; Tonoike et al., 1985; Tveteraas et al., 1985; Westermarck et al., 1981; White et al., 1975).

Ganz besonders amyloidogen erscheinen die V λ VI-Bence-Jones-Proteine, die fast in allen Fällen eine Amyloidose hervorrufen (Sletten et al., 1981; Solomon et al., 1982).

Die Optimierung der limitierten Proteolyse speziell für das BJP MEV ergab gegenüber den Versuchsbedingungen der Vorversuche lediglich eine Reduktion der Verdauungszeit bei sonst unveränderten Parametern. Daß es bei BJP MEV schneller zur Bildung der maximalen Präzipitatsmenge kommt, erklärt sich möglicherweise in einer für Trypsin leicht zugänglichen Spaltungsstelle in der Gegend zwischen V- und C-Teil. Eine längere Proteolyse würde zu weiteren Spaltungen der V- und C-Domänen führen, wobei die Ausbeute an Präzipitat mit Amyloidcharakter (bzw. V-Teil) geringer ausfallen würde.

Die schließlich für die weiteren Untersuchungen gewählten Versuchsbedingungen entsprachen bezüglich Temperatur (37° C) und pH (7,4) etwa physiologischen Verhältnissen. Die Konzentration des Bence-Jones-Proteins ist mit 10 mg Protein/ml im Vergleich zu den In-vivo-Verhältnissen (im Serum) sicher zu hoch; jedoch ist zu bedenken, daß hier ein Prozeß nachvollzogen werden soll, der im lebenden Organismus Monate bis Jahre erfordert, um dieselben Mengen an Amyloidfibrillen zu erzeugen.

Bisher sind zur In-vitro-Amyloidogenese Pepsin, Papain, sowie bisher nicht identifizierte Urinproteinasen (Linke et al., 1973) eingesetzt worden. Auch lysosomale Enzyme aus Nierenextrakten (Epstein et al., 1974) sind schon verwendet worden.

Das in dieser Arbeit benutzte Enzym war Trypsin. Da dieses, in vivo vor allem enteral vorkommt, die Amyloidogenese aber im Gewebe stattfindet, erscheint Trypsin nicht als das in vivo wirksame Prinzip. Es kann aber als ein gutes Modellenzym für andere neutrale Proteasen gelten, die z. B. aus Leukozyten freigesetzt werden. Zu denken ist an elastase- und chymotrypsinähnliche neutrale Proteasen von menschlichen Granulozyten, die Immunglobuline spalten können (Solomon et al., 1976). Welche Proteasen aber letztlich die entscheidende Rolle in der Amyloidentstehung in vivo spielen, ist nicht bekannt.

Bei der Verdauung bei unterschiedlichen Temperaturen verhalten sich V- und C-Teil verschieden. Bei 37° C wird vor allem der C-Teil, bei 55° C vor allem der V-Teil verdaut.

Nach Seon et al., 1971, findet sich die Erklärung möglicherweise in der größeren Zahl von hydrophoben Bindungen in der Tertiärstruktur des konstanten Teils im Vergleich zum variablen Teil, der in der Tertiärstruktur mehr Ionenbindungen aufweist. Diese Ionenbindungen besitzen gegenüber niedrigeren Temperaturen (37° C) eine höhere Stabilität als hydrophobe Bindungen, während es sich bei höheren Temperaturen (55° C) genau andersherum verhält.

Die immunchemische und chemische Analyse des In-vitro-Amyloids MEV entsprach dem natürlich vorkommenden Amyloid MEV, dessen Sequenz vorliegt (Eulitz und Linke, 1982). So stammen beide vom variablen Teil des BJP MEV, tragen antigene Determinanten der variablen Region und beginnen beide mit der N-terminalen Aminosäure (Asparaginsäure) der Bence-Jones-Protein- κ -Kette. Ferner wurde für beide eine molekulare Größe von etwa 11 000 Dalton gefunden, die der Größe des V-Teils des intakten BJP MEV entspricht.

Beim Vergleich der Hydrophobizität zwischen dem amyloidogenen Fragment gegenüber dem komplette BJP MEV fand sich eine deutlich größere Hydrophobizität des In-vitro-Amyloids.

Entsprechende Ergebnisse fanden sich bereits für SAAL, dessen Konzentration häufig bei chronischen Entzündungen im Serum ansteigt, und dem aus SAAL durch limitierte Proteolyse entstehendem Protein AA, dem Grundbaustein der Amyloidfibrillen bei dieser Form von Amyloidose. Auch dort weist das amyloidogene Fragment, in diesem Fall Protein AA eine deutlich größere Hydrophobizität als das amphiphile SAAL auf. Analog den Verhältnissen bei Bence-Jones-Proteinen befindet sich auch dort der Hauptanteil der hydrophoben Strukturen am N-terminalen Ende von SAAL, aus dem das Protein AA entsteht (Linke et al., 1975; Linke, 1980).

Schließlich konnte auch für das Gehirnamyloid bei der Alzheimerschen Krankheit nachgewiesen werden, daß es hydrophobe Fragmente amphiphiler Proteine sind, die vermutlich durch Membranen permeieren und die Amyloidplaques bilden (Glenner, 1983; Glenner und Wong, 1984; Kang, 1987).

Möglicherweise liegt hierin ein wesentliches Element für das Verständnis der Amyloidogenese: Die enzymatische Abspaltung von bestimmten hydrophilen Peptiden aus dem Vorläuferprotein führt zu stärker hydrophoben Fragmente. Durch den Anfall grösserer Mengen solcher stabilen hydrophoben intermediären Peptide, wie sie z. B. beim Multiplen Myelom vorkommen, ist der Organismus nicht mehr in der Lage, diese in Lösung zu halten oder abzubauen. Es kommt zur Ausfällung und damit zur Ablagerung in Form von Amyloidfibrillen.

Darüberhinaus konnten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einen Einblick in die Entstehungsweise der Amyloidablagerungen geben:

Es fällt eine baumartige Struktur, in der die Amyloidfibrillen angeordnet sind, auf. Diese weist auf ein apositionelles Wachstum durch seitliche Aggregation der Fibrillen hin. Auf Grund des organischen Aufbaus der dargestellten Fibrillen kann man einen Artefakt (Trocknungsmuster) als Ursache weitgehend ausschließen. In diesem Fall hätte man eine heterogene Anordnung in einzelne Fibrillenhaufen über das ganze elektronenoptische Netz erwarten können und nicht jedoch "Amyloidbäumchen". Auch spricht für eine natürliche Anordnung und gegen eine Artefakt, daß es sich bei dem amyloidogenen Fragment des BJP MEV um ein unlösliches Präzipitat handelt.

Aus den molekularen, antigenen, physiochemischen und morphologischen Analysen geht klar hervor, daß das hier in vitro hergestellte Amyloid des BJP MEV im Vergleich zum natürlichen Amyloid nicht unterschieden werden kann. Die in dieser Arbeit entwickelte limitierte Proteolyse kommt daher den In-vivo-Verhältnissen sehr nahe und darf daher als sehr gutes Modell für die Amyloidogenese in vivo gelten. Durch diese Imitation des Vorgangs in vivo konnten neue Erkenntnisse über die Amyloidbildung gewonnen werden und damit einen Ansatz für weitere Untersuchungen zur Pathogenese der Amyloidose eröffnen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Benditt, E.P., Cohen, A.S., Costa, P.P., Franklin, E.C., Glenner, G.G., Husby, G., Mandema, E., Natvig, J.B., Osserman, E.F., Sohar, E., Wegelius, O. and Westermarck, P., (1980), Guidelines for nomenclature. In: Amyloid and Amyloidosis, Glenner, G.G., Costa, P.P., Freitas, F. (Editors), Excerpta Medica, Amsterdam (p. XI)
- Benditt, E.P. and Eriksen, K.H. (1971), The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences, FEBS Letters 19, 169
- Benditt, E.P. and Eriksen, N. (1971), Chemical classes of amyloid substance, Am. J. Pathol. 65, 231
- Cohen, A.S. (1967), Amyloidosis, N. Engl. J. Med. 277, 522, 574, 628
- Cohen, A.S. and Calkins, E. (1959), Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins, Nature 183, 1202
- Cohen, A.S. and Calkins, E. (1964), The isolation of amyloid fibrils and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase, J. Cell Biol. 21, 481
- Cohen, D.H., Feiner, H., Jensson, O. and Frangione, B. (1983), Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA) is related to the gastroenteropancreatic neuroendocrine protein, gamma trace, J. exp. Med. 158, 623
- Costa, P.P., Figueira, A.S. and Bravo, F.R. (1978), Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy, Proc. nat. Acad. Sci. USA 75, 4499
- Ein, D. and Glenner, G.G. (1968), X-ray diffraction studies on amyloid filaments, J. Histochem. Cytochem. 16, 673
- Epstein, W.V., Tan, M. and Wood, I. S. (1974), Formation of amyloid fibrils in vitro by action of human kidney lysosomal enzymes in Bence Jones proteins, J. Lab. Clin. Med. 84, 107
- Eulitz, M., Breuer, M. and Linke, R.P. (1987), Is the formation of AL-type amyloid promoted by structural peculiarities of immunoglobulin L-chains? Primary structure of an amyloidogenic λ -I-chain (BJP-ZIM), Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 863

Eulitz, M. and Linke, R.P. (1982), Primary Structure of the variable part of an amyloidogenic Bence-Jones Protein (Mev.). An unusual insertion in the third hypervariable region of a human α -immunoglobulin light chain, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1347

Fielder, K. and Durie, B.G.M. (1986), Primary amyloidosis associated with multiple myeloma. Predictors for successful therapy, Am. J. Med. 80, 413

Friedreich, N. and Kekulé, A. (1859), Zur Amyloidfrage, Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 16, 50

Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M., Kunitomo, T., Kataoka, H., Suzuki, M., Hirasawa, Y., Shirahama, T., Cohen, A.S. and Schmid, K. (1985), A new form of amyloid protein with chronic hemodialysis was identified as B₂-microglobulin, Biochem. Biophys. Res. Comm. 129, 701

Glenner, G.G. (1980), Amyloid deposits and amyloidosis. The β -fibrilloses, New Engl. J. Med. 302, 1283, 1333

Glenner, G.G. (1983), Alzheimer's Disease, Arch. Pathol. Lab. Med. 107, 281

Glenner, G.G., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Linke, R.P. and Termine, J.D. (1974), β -pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils, J. Histochem. Cytochem. 22, 1141

Glenner, G.G., Eanes, E.D. and Page, D.L. (1972), The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the β -conformation, J. Histochem. Cytochem. 20, 821

Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W.D. and Page, D. (1971), The creation of "amyloid" fibrils from Bence Jones proteins in vitro, Science 174, 712

Glenner, G.G., Ein, D. and Terry, W.D. (1972), The immunoglobulin origin of amyloid, Am. J. Med. 52, 141

Glenner, G.G. and Page, D.L. (1976), Amyloid, amyloidosis and amyloidogenesis, Intern. Rev. Exp. Pathol. 15, 1

Glenner, G.G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C. and Page, D. (1971), Amyloid fibril proteins. Proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses, Science 172, 1150

- Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984), Alzheimer's disease. Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120, 835
- Helenius, A. and Simons, K. (1977), Charge shift electrophoresis. Simple method for distinguishing between amphiphilic and hydrophilic proteins in detergent solution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 529
- Hofman-Guilaine, C., Nochy, D., Jacpuot, C., Tricottet, V., Bariety, J. and Camilleri, J.P. (1985), Association light chain deposition disease (LCDD) and amyloidosis. One case, *Path. Res. Pract.* 180, 214
- Husby, G. (1980), Amyloidosis and rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol.* 3, 173
- Husby, G. and Sletten, K. (1980), The structure of amyloid proteins. In: Glenner, G.G., Costa, P.F., Falcao de Freitas, A. (Editors), *Amyloid and amyloidosis*, Excerpta Medica, Amsterdam, (p. 266)
- Husby, G., Sletten, K., Blumenkrantz, N. and Danielsen, L. (1981), Characterization of an amyloid fibril protein from localized amyloidosis of the skin as λ immunoglobulin light chains of variable subgroup I (λ AI), *Clin. Exp. Immunol.* 45, 90
- Isobe, T., Osserman, E.F. (1984), Patterns of amyloidosis and their association with plasma-cell dyscrasia, monoclonal immunoglobulins and Bence-Jones proteins, *N. Engl. J. Med.* 290, 473
- Kang, J. Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Müller-Hill, B. (1987), The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature* 325, 733
- Kedar, I., Ravid, M. and Sohar, E. (1976), In-vitro synthesis of "amyloid" fibrils from insulin, calcitonin and parathyroid hormone, *Israel J. Med. Sci.* 12, 1137
- Kimura, S., Guyer, R., Terry, W.D. and Glenner, G.G. (1972), Chemical evidence for λ -type amyloid fibril proteins, *J. Immunol.* 109, 891

Kyle, R.A., Greipp, P.R., Garton, J.P. and Gertz, M.A. (1985), Primary systemic amyloidosis. Comparison of melphalan/pred-nison versus colchicine, *Am. J. Med.* 79, 708

Ladewig, P. (1945), Double-refringence of the amyloid-congo-red-complex in histological sections, *Nature* 156, 81

Levin, M., Franklin, E.C., Francione, B. and Pras, M. (1972), The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils, *J. Clin. Invest.* 51, 2773

Linke, R.P. (1978), Identification of "pre-amyloid" derived from a Bence-Jones protein by trypsin digestion. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leucocytes*, Havemann, K. Janoff, A. (Editors), Urban & Schwarzenberg, 439

Linke, R.P. (1980), Amphiphilic properties of the low molecular weight component of serum amyloid-A protein shown by charge-shift electrophoresis, *Biochem. Biophys. Acta* 668, 388

Linke, R.P. (1982), Die chemische Analyse von Amyloid als Grundlage einer neuen Klassifizierung der Amyloidosen, *Habilitationsschrift*, München

Linke, R.P. (1983), Amyloidosen. In: *Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis*, Vorlaender, K.O. (Editor), Thieme, 251

Linke, R.P. (1985), Pathogenicity of immunoglobulin variable regions. "V-regions disease", *Path. Res. Pract.* 180, 217

Linke, R.P. (1985), Amyloid fibril proteins, their soluble precursors and some new aspects. In: *Degenerative disease of connective tissue and aging*, Robert, R. and Murata, K. (Editors), Kodansha Ltd. Publ. Comp., 167

Linke, R.P. (1987), Die Amyloidosen. Pathogenetisch exakte Klassifizierung und Möglichkeit einer Amyloidtyp-spezifischen Therapie, *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 16, 144

Linke, R.P., Eanes, E.D., Termine, J.D., Bladen, H.A. and Glenner, G.G. (1976), Formation of amyloid-like fibrils from insulin and glucagon in vitro. In: *Amyloidosis*, Wegelius, O., Pasternak, A. (Editors), Academic Press, 371

Linke, R.P., Heilmann, K.L., Nathrath, W.B.J. and Eulitz, M. (1983), Identification of amyloid A protein in a sporadic Muckle-Wells syndrome, N-terminal amino acid sequence after isolation from formalin-fixed tissue, *Lab. Invest.* 46, 698

- Linke, R.P., Sipe, J.D., Pollock, P.S., Ignaczak, T.F. and Glenner, G.G. (1975), Isolation of a low-molecular weight serum component antigenetically related to an amyloid fibril protein of unknown origin, *Proc. nat. Acad. Sci.* 72, 1473
- Linke, R.P., Tischendorf, F.W., Zucker-Franklin, D. and Franklin, E.C. (1973), The formation of amyloid-like fibrils in vitro from Bence Jones proteins of the V λ I subclass, *J. Immunol.* 111, 24
- Linke, R.P., Zucker-Franklin, D. and Franklin, E.C. (1973), Morphologic, chemical and immunochemical studies of amyloid-like fibrils formed from Bence Jones proteins by proteolysis, *J. Immunol.* 111, 10
- Lubarsch, O. (1929), Zur Kenntnis ungewöhnlicher Amyloidablagerungen, *Virchows Arch. Path. Anat.* 271, 367
- Miller, F. and Metzger, H. (1965), Characterization of a human macroglobulin. I. The molecular weight of the subunit, *J. Biolog. Chem.* 240, 3325
- Missmahl, H.P. and Hartwig, M. (1953), Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloids substanz, *Virchows Arch. Path. Anat.* 324, 480
- Natvig, J.B., Westermarck, P., Sletten, K., Husby, G. and Michaelsen, T. (1981), Further structural antigenetic studies of light chain amyloid proteins, *Scand. J. Immunol.* 14, 89
- Osserman, E.F., Takatsuki, K. and Tatal, N. (1964), The pathogenesis of "amyloidosis", *Semin. Hematol.* 1, 3
- Ouchterlony, O. (1958), Diffusion-in-gel methods for immunological analysis, *Prog. in Allergy* 5, 1
- Ouchterlony, O. and Nilsson, L.Å. (1978), Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: Immunochimistry, Weir, D.M. (Editor), 3rd ed., 19, 1
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimón, A. and Franklin, E.C. (1968), The characterization of soluble amyloid prepared in water, *J. Clin. Invest.* 47, 924
- Puchtler, H., Sweat, F. and Levine, M. (1962), On the binding of Congo red by amyloid, *J. Histochem. Cytochem.* 13, 693

Randall, R.E., Williamson, W.C., Mullinax, F., Tung, H.Y. and Still, W.J.S. (1976), Manifestation of systemic light chain deposition, *Am. J. Med.* 60, 293

Romhányi, G. (1956), Zur Frage der submikroskopischen Struktur des Amyloids, *Zbl. Allg. Path.* 95, 130

Rosenthal, C.J. and Franklin, E.C. (1975), Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component, *J. Clin. Invest.* 55, 746

Scherwitz, C., Linke, R.P. und Schmitt, F.J. (1986), Amyloidose vom A-kappa-Typ, *Der Hautarzt* 37, 343

Seon, B.K., Roholt, O.A. and Pressman, D. (1971), Differences in the enzymatic digestibility of the variable and constant halves of Bence-Jones protein with temperature, *Immunochemistry* 8, 585

Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, Jr., J.V. (1967), Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815

Shirahama, T., Benson, M.D., Cohen, A.S. and Tanaka, A. (1973), Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains. An electron microscopic study, *J. Immunol.* 110, 21

Skinner, M., Benson, M.D. and Cohen, A.S. (1974), Amyloid fibril protein related to immunoglobulin chains, *J. Immunol.* 114, 1433

Sletten, K. and Husby, G. (1974), The complete amino acid sequence of non-immunoglobulin amyloid fibril protein AS in rheumatoid arthritis, *Eur. J. Biochem.* 41, 117

Sletten, K., Natvig, J.B., Husby, G. and Juul, J. (1981), The complete amino acid sequence of a prototype light chain type amyloid fibril protein AR, *Biochem. J.* 195, 561

Sletten, K., Husby, G. and Natvig, J.B. (1974), N-terminal amino acid sequence of amyloid fibril protein AR, prototype of a new λ -variable subgroup, V λ V, *Scand. J. Immunol.* 3, 833

Sletten, K., Westermarck, P. and Husby, G. (1986), Structural studies of the variable regions of immunoglobulin light chain type amyloid fibril proteins. In: *Amyloidosis*, Glenner, G.G. (Editor), Plenum Publ. Corp.

Sletten, K., Westermarck, P. and Natvig, J.B. (1980), Senile cardiac amyloid is related to prealbumin, *Scand. J. Immunol.* 12, 503

- Sletten, K., Westermark, P. and Natvig, J. (1976), Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid, *J. Exp. Med.* 143, 993
- Sletten, K., Westermark, P., Pitkänen, P., Thyresson, N. and Olsad, O.K. (1983), Amino acid sequences in amyloid proteins of κ III-immunoglobulin light-chain origin, *Scand. J. Immunol.* 18, 557
- Solomon, A., Frangione, B. and Franklin, E.C. (1982), Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins: preferential association of the V λ VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (λ), *J. Clin. Invest.* 70, 453
- Solomon, A. and McLaughlin, C.L. (1969), Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins. 1. Formation and characterization of amino-terminal (variant) and carboxyl-terminal (constant) halves, *J. Biol. Chem.* 244, 3393
- Solomon, A., Schmidt, W., Havemann, K. (1976), Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins. XIII. Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases derived from human granulocytes on Bence-Jones proteins, *J. Immunol.* 117, 1010
- Takahashi, N., Takayasu, T., Shinoda, T., Ito, S., Okuyama, T. and Shimizu, A. (1980), Amino acid sequence of a lambda Bence-Jones protein from a case of primary amyloidosis, *Biochem. Res.* 1, 321
- Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. and Araki, S. (1983), Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 880
- Terry, W.D., Page, D., Kimura, S., Isobe, T., Osserman, E. and Glenner, G.G. (1973), Structural identity of Bence Jones and amyloid fibril proteins in a patient with plasma cell dyscrasia and amyloidosis, *J. Clin. Invest.* 52, 1276
- Toft, K.G., Sletten, K. and Husby, G. (1985), The amino-acid sequence of the variable region of a carbohydrate-containing amyloid fibril protein EPS (immunoglobulin light chain, type λ), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 617
- Tonoike, H., Kametani, F., Hoshi, A., Shinoda, T. and Isobe, T. (1985), Primary structure of the variable region of an amyloidogenic Bence Jones protein NIG-77, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126, 1228
- Tveteraas, T., Sletten, K. and Westermark, P. (1985), The amino acid sequence of a carbohydrate-containing immunoglobulin-light-chain-type amyloid-fibril protein, *Biochem. J.* 232, 1833

Virchow, R. (1854), Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefunden Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose, Virchows Arch. Path. Anat. 6, 135

Weber, K. and Osborn, M. (1975), Proteins and sodium dodecal sulfate: Molekular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: The proteins. 3rd edition. Vol. 1, Neurath, H. and Hill, R.L. (Editors), Academic Press, New York, p. 179

Wegelius, O. and Pasternak, A. (Editors), (1977), Amyloidosis, Academic Press, New York

Westermarck, P., Sletten, K. and Natvig, J.B. (1981), Structure and antigenic behaviour of kappa-I immunoglobulin light-chain amyloid proteins, Acta pathol. microbiol. scand. Sect. C 89, 199

White, G.C., Jacobson, R.J., Binder, R.A., Linke, R.P. and Glenner, G.G. (1975), Immunoglobulin D myeloma and amyloidosis: immunochemical and structural studies of Bence Jones and amyloid fibrillar proteins, Blood 46, 713

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Immunologie, Goethestraße 31, 8000 München 2, Vorstand Prof. Dr. med. G. Riethmüller, angefertigt.

Herrn Privatdozent Dr. med. R. P. Linke danke ich für die Überlassung des Themas und die große Mühe, die er sich sowohl bei der experimentellen Durchführung als auch bei der Niederschrift der Arbeit gegeben hat.

Insbesondere gilt mein Dank auch den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Barbara Linke, Frau Sylvia Wegscheider und Frau Jutta Tübel, für die zahlreichen Ratsschläge und Hilfen beim experimentellen Teil dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. med. M. Eulitz, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Abteilung Immunologie, für die Sequenzen der BJP MEV, NYM und ZIM, sowie des Amyloids MEV und des In-vitro-Amyloids MEV.

Herrn Prof. Dr. Huhn und seiner Mitarbeiterin Frau Darsow, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Abteilung Klinische Hämatologie im Institut für Hämatologie, danke ich für die elektronenoptischen Aufnahmen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Privatdozent Dr. med. F. W. Tischendorf für die Subgruppenbestimmungen der übrigen genannten BJP und Herrn Dr. med. Fuhrmann für die Aufnahme der Zunge der Patientin MEV.

LEBENS LAUF

6. 8. 1957	geboren in Memmingen
1963 - 1967	Volksschule in Memmingen
1967 - 1970	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
1970 -1974	Realschule in Memmingen
Juli 1974	Mittlere Reife
1974 -1977	Allgäu-Gymnasium Kempten
Juli 1977	Abitur
Sept. 1977 - Dez. 1978	Zivildienst am Städtischen Krankenhaus Kempten
1979 -1985	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Juni 1985	Approbation als Arzt
seit Okt. 1985	Assistenzarztstätigkeit beim Krankenhaus- zweckverband Augsburg

